

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Кемеровский государственный университет»

На правах рукописи

Фотина Наталья Вячеславовна

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
НОВЫХ ШТАММОВ РИЗОБАКТЕРИЙ**

Специальность 4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически
активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор технических наук, доцент

Асякина Людмила Константиновна

Кемерово 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	10
1.1 Повышение пищевой и биологической ценности пшеницы как фактор продовольственной безопасности.....	10
1.2 Микроорганизмы в повышении продуктивности сельскохозяйственных культур.....	14
1.3 Биотехнологически ценные свойства микроорганизмов и перспективы их применения в АПК.....	17
1.4 Заключение по литературному обзору.....	33
ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента.....	35
2.2 Объекты исследования.....	37
2.3 Используемые материалы, реактивы и оборудование.....	39
2.4 Методы исследования.....	42
2.5 Заключение по главе 2.....	55
ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ.....	55
3.1 Выделение и характеристика ризобактерий яровой пшеницы...	56
3.2 Скрининг перспективных ризобактерий с биотехнологически ценными свойствами.....	63
3.3 Генетическая идентификация перспективных ризобактерий.....	80
3.4 Заключение по главе 3.....	83
ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСОРЦИУМОВ РИЗОБАКТЕРИЙ...	84
4.1 Конструирование бактериальных консорциумов на основе перспективных ризобактерий.....	84
4.2 Скрининг перспективных бактериальных консторциумов ризобактерий с биотехнологически ценными свойствами.....	86

4.3 Оценка эффективности влияния консорциумов на рост и развитие пшеницы в условиях биотического стресса.....	96
4.4 Биоинформатический анализ кластеров генов.....	101
4.5 Исследование цитотоксических свойств бактериальных штаммов.....	113
4.6 Заключение по главе 4.....	116
ГЛАВА 5 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	119
5.1 Подбор условий культивирования биопрепарата «БП-010» на основе бактериального консорциума ризобактерий.....	119
5.2 Экономическая оценка производства разработанного биопрепарата «БП-010».....	124
5.3 Заключение по главе 5.....	127
РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	129
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	131
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Обеспечение населения безопасными и качественными продуктами питания представляет собой приоритетную задачу государства в контексте устойчивого развития. Ключевая роль в решении этой задачи принадлежит эффективному и экологически безопасному производству сельскохозяйственной продукции. В условиях роста технологических рисков и глобальных вызовов, обеспечение продовольственной безопасности и конкурентоспособности отечественной продукции на мировых рынках является одним из важнейших направлений развития страны. Это требует перехода к высокопродуктивным и экологически чистым технологиям, а также разработки и внедрения систем рационального применения биологических средств защиты и улучшения качества сырья, в том числе и зерновых культур, что отражено в Федеральной научно-технической программе развития сельского хозяйства. Особая важность экологизации и безопасности производства продовольствия подчеркивается в Национальном проекте «Технологическое обеспечение продовольственной безопасности».

Интенсификация сельскохозяйственного производства с использованием высоких доз агрохимикатов и пестицидов, сопряжена с рядом негативных последствий для агроэкосистем. Несбалансированное внесение минеральных удобрений, в частности азотных, способствует эвтрофикации водоемов и увеличению эмиссии парниковых газов. Применение пестицидов широкого спектра действия негативно влияет на структуру почвенной микробиоты, снижая ее биоразнообразие и активность.

В связи с этим, разработка и внедрение бактериальных препаратов на основе штаммов ризобактерий является перспективным направлением. Это обусловлено их потенциально пролонгированным действием, способностью мобилизовать естественный потенциал почвы, контролировать распространение фитопатогенов, снижая зависимость от агрохимикатов и уменьшая риск развития устойчивости к

ним. Кроме того, применение бактериальных препаратов может потенциально улучшить технологические свойства зерна при переработке. Использование ризобактерий открывает новые возможности для повышения качества и безопасности сырья для пищевой промышленности. В частности, важным направлением является повышение качества зерновых культур, которые являются основой рациона питания и важным сырьем для многих отраслей пищевой промышленности. Яровая мягкая пшеница выбрана в качестве модельной культуры для оценки эффективности разработанного биопрепарата, как один из наиболее значимых видов зерновых культур и важный источник сырья для пищевой промышленности.

Степень разработанности темы. Существенный вклад в развитие инновационных технологий в области сельского хозяйства, в частности создания бактериальных препаратов, внесли отечественные и зарубежные исследователи: И.А. Тихонович, А.А. Белимов, В.С. Шевелуха, Е.П. Трепачев, Т.К. Шешегова, Л.В. Кравченко, И.В. Максимов, М.В. Безрукова, О.Н. Кулаева, А.П. Кожемяков, Д.С. Веселов, Л.И. Пусенкова, А.А. Завалин, П.В. Поползухин, A.L. Khan, A. Al-Harrasi, S. Sarrocco, A. Khalid и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках:

– государственного задания по теме «Фундаментальные исследования по разработке биопестицидов, состоящих из экстремофильных и эндофитных микроорганизмов, для преодоления абиотического и биотического стресса сельскохозяйственными культурами в условиях Кемеровской области-Кузбасса» (шифр FZSR-2023-0003);

– государственного задания по теме «Исследование потенциала ростостимулирующих бактерий для повышения агрономической биофортификации пшеницы» (шифр FZSR-2024-0009).

Цели и задачи работы. Теоретическое и экспериментальное обоснование биотехнологических приемов создания биопрепарата на основе новых штаммов ризобактерий для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- отобрать ризобактерии зерновых культур, проявляющие устойчивость к стрессовым факторам (агрохимикатам, высокой степени засоления) и способные эффективно развиваться на средах с ограниченным содержанием питательных веществ, что обеспечит их применение в различных условиях культивирования;
- провести скрининг перспективных ризобактерий, оценивая их способность продуцировать фитогормоны, фиксировать атмосферный азот, солюбилизовать фосфаты, проявлять антиоксидантную и антагонистическую активность в отношении фитопатогенов;
- установить видовую и родовую принадлежность отобранных ризобактерий;
- сконструировать консорциумы на основе биосовместимых штаммов ризобактерий, проявляющих синергетический эффект; исследовать влияние перспективных составов консорциумов на показатели развития модельной культуры (яровой мягкой пшеницы) в лабораторных условиях; определить генетический потенциал ризобактерий, входящих в состав отобранного консорциума, в части синтеза биоактивных соединений и оценить их цитотоксичность в условиях *in vitro*;
- оптимизировать биотехнологические параметры культивирования разработанного биопрепарата на основе выбранного консорциума ризобактерий с целью достижения максимальной эффективности и стабильности;
- оценить экономическую целесообразность производства биопрепарата.

Научная новизна работы. Научно обоснован подход к созданию эффективных биопрепаратов для зерновых культур на основе ризобактерий, устойчивых к абиотическим стрессам. Впервые показано, что комплексный скрининг и отбор штаммов по признакам устойчивости к засолению, агрохимикатам и дефициту питательных веществ позволяет выявить перспективные бактериальные штаммы для разработки универсальных биопрепаратов. Установлено, что консорциум на основе выделенных штаммов ризобактерий *Pantoea agglomerans* В-14726 и *Pantoea vagans* В-14727 обладает синергетическим ростостимулирующим эффектом в отношении модельной культуры (яровой мягкой пшеницы). Впервые показано, что геном ризобактерий, входящих в состав консорциума, содержит кластеры генов,

детерминирующих синтез сидерофоров, терпенов и антибиотиков, что обуславливает его антагонистический потенциал.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационной работы расширяют современные представления о разнообразии и функциональной роли ризобактерий и обосновывают перспективы их применения в агробιοтехнологиях.

Депонированы пять новых перспективных штаммов ризобактерий в Биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»: *Bacillus thuringiensis* B-14700, *Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726, *Pantoea vagans* B-14727 (справки о депонировании № 14700, 14701, 14725, 14726, 14727 от 05.08.2024 г.).

Подобраны биотехнологические параметры культивирования биопрепарата «БП-010» на основе консорциума ризобактерий *Pantoea agglomerans* B-14726 и *Pantoea vagans* B-14727.

Разработана техническая документация на биопрепарат «БП-010».

Проведена экономическая оценка производства биопрепарата «БП-010», расчетная стоимость 10 л составляет 4101,16 руб.

Методология и методы исследования. При выполнении работы использовались общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований, включающие: микробиологические методы выделения и культивирования микроорганизмов, методы оценки их морфологических, культуральных и биохимических свойств, молекулярно-генетические методы идентификации штаммов, методы анализа биотехнологически ценных свойств штаммов ризобактерий и консорциумов на их основе, методы подбора параметров культивирования разработанного биопрепарата.

Основные положения, выносимые на защиту:

– научно обоснованная концепция создания универсальных биопрепаратов на основе ризобактерий, устойчивых к абиотическим стрессам и обладающих

комплексом биотехнологически ценных свойств (фиксация атмосферного азота, солюбилизация фосфатов, синтез фитогормонов, антагонистическая активность);

– результаты комплексной характеристики 42 штаммов ризобактерий, выделенных из ризосферы зерновых культур, включающие оценку устойчивости к стрессовым факторам и выявление штаммов-продуцентов биологически активных веществ (*Bacillus thuringiensis* B-14700, *Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726, *Pantoea vagans* B-14727);

– разработка и характеристика нового биопрепарата «БП-010» на основе консорциума ризобактерий *Pantoea agglomerans* B-14726 и *Pantoea vagans* B-14727, обеспечивающего стимуляцию роста модельной культуры (яровой мягкой пшеницы);

– биотехнологические параметры культивирования биопрепарата «БП-010», обеспечивающие его стабильность и рентабельность.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений (3–5-кратной повторностью), применением стандартных и общепринятых методов исследования, которые соответствуют цели и задачам работы. Основные положения и результаты исследований диссертационной работы были предметом докладов и обсуждений на мероприятиях различного уровня: Международной научной и научно-практической конференции «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2023); Научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные проблемы агропромышленного комплекса» (Самара, 2023), Инновационном конвенте «Кузбасс: образование, наука, инновации» (Кемерово, 2023, 2024), Международном симпозиуме, посвященном 50-летию КемГУ «Пищевые здоровьесберегающие технологии» (Кемерово, 2023), BIO Web of Conferences: International Scientific and Practical Conference «Methods for Synthesis of New Biologically Active Substances and Their Application in Various Industries of the World Economy – 2023» (Москва, 2023).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 20 печатных работ, из них: 8 статей в рецензируемых изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и цитирования Scopus и Web of Science; 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК; 1 патент, 1 заявка на патент.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует п. 10, 13, 18, 21 паспорта научной специальности ВАК РФ 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ».

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка используемой литературы (231 наименование), и 4 приложений. Основной текст изложен на 174 страницах, содержит 28 таблиц, 28 рисунков.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Данная глава посвящена обсуждению вопросов, связанных с повышением пищевой и биологической ценности сельскохозяйственных культур, в частности пшеницы, как фактора продовольственной безопасности, с перспективами применения микроорганизмов для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Рассмотрены перспективные для агропромышленного комплекса ростостимулирующие свойства.

1.1 Повышение пищевой и биологической ценности пшеницы как фактор продовольственной безопасности

В условиях неуклонного роста численности населения планеты возрастает и нагрузка на агропродовольственную систему, требующая наращивания объемов производства сельскохозяйственной продукции. Современное сельское хозяйство, отвечая на этот вызов, активно внедряет инновационные технологии для повышения урожайности. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, проблема обеспечения населения полноценным питанием, богатым необходимыми микро- и макронутриентами, сохраняет свою актуальность. Статистические данные свидетельствуют о том, что в 2020 году дефицит микроэлементов затрагивал более двух миллиардов человек во всем мире [169, 216].

Состояние, при котором организм не испытывает недостатка в количестве потребляемой пищи, но нуждается в дополнительном поступлении микро- и макроэлементов, витаминов, получило название «скрытый голод» [27]. Данное состояние провоцирует развитие целого ряда алиментарно зависимых заболеваний, что превращает его в серьезную социальную проблему для нынешнего и будущих поколений [20, 55].

Проблема «скрытого голода» во многом обусловлена растущей зависимостью от дешевых, высококалорийных, но бедных питательными веществами продуктов с высокой степенью переработки, особенно среди населения с низким уровнем дохода [222, 223]. Кризисные явления в экономике усугубляют существующие проблемы с доступом к сбалансированному питанию, стоимость которого, по некоторым оценкам, превышает половину располагаемого дохода наиболее уязвимых слоев населения [120]. Это ограничивает доступ к основным источникам ключевых микроэлементов, таким как зеленые листовые овощи (источник фолиевой кислоты) и красное мясо и моллюски (источники железа и цинка) [146].

Существенный вклад в проблему вносит сохраняющаяся ориентация сельского хозяйства на достижение высоких показателей урожайности без должного внимания к качеству питания, а также снижение содержания биодоступных минеральных веществ в почвах. Интенсификация методов ведения сельского хозяйства привела к уменьшению концентрации микроэлементов в ряде основных продуктов питания и садовых культур во многих странах [61, 65, 172, 194, 204]. Более того, изменение климата, по прогнозам, негативно скажется на содержании микроэлементов в важнейших сельскохозяйственных культурах, что создает дополнительную угрозу продовольственной безопасности в будущем [17, 118, 168, 212].

Пшеница (*Triticum* spp.) является одним из важнейших источников калорий для значительной части населения мира, занимая второе место среди зерновых культур [58, 140–142]. Она обеспечивает до 28 % мирового съедобного сухого вещества и до 60 % ежедневного потребления калорий в развивающихся странах [62]. Продукты из пшеницы обеспечивают около 20 % белка и энергии в рационе среднестатистического человека [142]. Зерно пшеницы состоит из трех основных компонентов: отруби (богатые клетчаткой, витаминами группы В и минералами), эндосперм (содержащий углеводы, липиды и белки, такие как глобулины, альбумины, глюteniны и глиадины) и зародыш (богатый витаминами, минералами и полезными жирами). Соотношение этих

компонентов составляет: отруби – 13–17 %, эндосперм – 80–85 %, зародыш – 2–3 % от общей массы зерна [161, 180].

С точки зрения обеспечения населения необходимыми питательными веществами, пшеница является одним из основных источников углеводов, белков, витаминов и минералов [28, 84]. В ее составе содержатся такие важные элементы, как магний, молибден, калий, цинк, алюминий, медь, фосфор, сера, железо и селен, а также ряд незаменимых аминокислот, включая валин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, аланин, глутамин, пролин, метионин, глицин, фенилаланин, треонин, лейцин, аргинин, триптофан, изолейцин, тирозин, серин, гистидин и лизин. Таким образом, пищевой профиль зерна пшеницы оказывает существенное влияние на здоровье и благополучие человека, особенно в развивающихся странах, где пшеница составляет значительную часть рациона [182].

Несмотря на непрерывный рост производительности сельского хозяйства, в последние годы наблюдается тенденция к снижению качества питания производимой продукции, особенно среди высокоурожайных зерновых культур, включая пшеницу [25, 75]. Важно отметить, что одомашненные сорта пшеницы характеризуются более низкими уровнями содержания микроэлементов и ограниченной генетической изменчивостью по сравнению с дикими сородичами [15, 44]. В процессе селекции на повышение урожайности, особенно при создании высокоурожайных полукарликовых сортов, произошло снижение концентрации микроэлементов в зерне за счет эффекта «разбавления» [112]. Исследования, изучавшие генетическое разнообразие 80 генотипов пшеницы, показали, что уровень содержания Zn и Fe снижался в среднем на 0,13 мг/кг в год в абсолютном выражении, и на 0,3 % в год в относительном выражении за последние 70 лет. Кроме того, научные данные указывают на снижение содержания Se в зерне пшеницы на фоне увеличения урожайности в последние десятилетия [138]. Это подчеркивает необходимость селекции сортов с повышенным содержанием Se и других важных микроэлементов.

Эффект «разбавления» связан с непропорционально большим накоплением крахмала в эндосперме пшеницы в результате селекции на повышение урожайности. В результате, высокоурожайные генотипы характеризуются более

низким содержанием Zn и Fe, в то время как низкоурожайные генотипы имеют более высокий уровень этих микроэлементов [112]. Снижение содержания Zn и Fe наблюдается также у диплоидных (2х) предшественников тетраплоидной (4х) и гексаплоидной пшеницы (6х). Дикie формы синтетической гексаплоидной пшеницы демонстрируют содержание Zn и Fe, в 2–3 раза превышающее показатели современных сортов пшеницы [108].

В связи с этим, чрезмерное потребление пшеничных продуктов может усугубить дефицит микроэлементов у человека, обусловленный низким уровнем незаменимых микроэлементов (Fe, Zn, Se, Cu) и наличием антипитательных факторов, ограничивающих их биодоступность [85, 165]. Следует учитывать, что алейроновый слой зерна пшеницы, богатый микроэлементами, часто удаляется в процессе переработки. Следовательно, существует острая необходимость в повышении концентрации микроэлементов в зерне и улучшении их биодоступности.

Согласно рекомендованным нормам потребления взрослым мужчинам и женщинам необходимо приблизительно 10–15 мг Fe, 9–15 мг Zn, 0,055 мг Se и 1,0–1,6 мг Cu в день [191]. Повышение содержания этих микроэлементов в зерне пшеницы является важным шагом на пути к улучшению здоровья населения. В среднем, зерно пшеницы содержит 28,48 мг/кг Zn [184]. Несмотря на относительно низкую рекомендуемую суточную потребность в Zn (11 мг для мужчин и 8 мг для женщин), для адекватного обеспечения организма этим микроэлементом необходимо увеличить его содержание в пшенице до 45 мг/кг [202].

Еще одной важной причиной низкого накопления микро- и макроэлементов, а также витаминов сельскохозяйственными культурами, в частности пшеницей, является снижение плодородия возделываемых почв [92, 130]. Так, например, в Кузбассе наблюдается продолжающееся снижение плодородия почв, обусловленное недостаточным внесением минеральных удобрений и выносом питательных веществ с урожаем. Резкое сокращение применения органических и минеральных удобрений приводит к снижению содержания гумуса, обменного калия и подвижного фосфора, что в свою очередь ведет к деградации почв [48].

Анализ состояния почвенного плодородия сельскохозяйственных земель Кемеровской области за период 2012–2016 гг. выявил критическое снижение уровня применения минеральных и органических удобрений, что объясняется переходом к экстенсивному типу земледелия. Данная тенденция, в свою очередь, приводит к прогрессирующему истощению почв и снижению урожайности сельскохозяйственных культур. Представлены данные о вариабельности норм внесения минеральных удобрений в указанный период, варьирующихся от 2,7 до 10,6 кг/га действующего вещества (д.в.). Отмечено, что максимальные значения (10,6 кг/га д.в., с соотношением макроэлементов N:P:K = 90:7:3) были зафиксированы в 2012 году, вероятно, в качестве компенсационной меры после неблагоприятных погодных условий. Однако после аномально засушливого вегетационного периода 2012 года наблюдалось резкое сокращение внесения минеральных удобрений, достигнувшее минимального уровня (2,7 кг/га д.в., N:P:K = 78:15:7) в 2014 году. Указано, что внесение органических удобрений за весь период не превышало 0,2–0,3 т/га [49]. На основании представленных данных делается вывод о необходимости разработки и внедрения научно обоснованных программ оптимизации минерального питания растений, направленных на предотвращение дальнейшей деградации почв и повышение пищевой и биологической ценности сельскохозяйственных культур, в частности пшеницы, в Кемеровской области.

1.2 Микроорганизмы в повышении продуктивности сельскохозяйственных культур

Проблема повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, в частности пшеницы, является одной из ключевых в обеспечении продовольственной безопасности. В последние годы все большее внимание уделяется использованию микроорганизмов в качестве экологически безопасного и эффективного инструмента для достижения этой цели. Микроорганизмы

обладают разнообразными механизмами, позволяющими оказывать положительное влияние на рост и развитие растений [1, 35, 84, 207].

Одним из основных механизмов прямого стимулирования роста растений является продукция фитогормонов бактериями, в частности ауксинов, цитокининов и гиббереллинов [37, 59, 73]. Многочисленные исследования выявили широкий спектр ростостимулирующих микроорганизмов, способных синтезировать ауксины, прежде всего индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) [29, 60]. Среди наиболее известных продуцентов ИУК выделяются представители родов *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Pantoea*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhodococcus* и *Streptomyces* [32, 59, 83, 189].

Растения проявляют высокую чувствительность к концентрации ИУК в тканях. Воздействие этого фитогормона на растение проявляется в стимуляции деления и элонгации клеток, формировании корневой системы, листьев, цветов, а также в регуляции процессов развития и старения. Кроме того, ИУК участвует в фотосинтезе, биосинтезе метаболитов и формировании стрессоустойчивости.

Микробный синтез других фитогормонов, таких как гиббереллины, изучен в меньшей степени. Полный путь биосинтеза бактериального гиббереллина был описан сравнительно недавно [183]. В связи с этим поиск микроорганизмов-продуцентов данного фитогормона представляет особый интерес для сельского хозяйства [37]. На сегодняшний день идентифицировано около 136 гиббереллиновых кислот, которые могут быть получены путем микробного синтеза [56, 78, 82]. Эти соединения оказывают стимулирующее воздействие на метаболические процессы в растениях, включая прорастание семян, удлинение стебля, цветение и образование плодов.

Цитокинины являются еще одной важной группой фитогормонов, продуцируемых микроорганизмами [66]. Сообщается об их присутствии в культуральных фильтратах ряда бактерий, таких как *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* [29]. Несмотря на то, что данные микроорганизмы признаны эндофитами и способны стимулировать рост растений, роль бактериальных цитокининов в ростостимуляции долгое время оставалась недооцененной из-за

ограниченного числа исследований. Однако в последнее время появляется все больше данных, подтверждающих стимулирующее действие микробных цитокининов на рост растений [51]. Например, в исследовании В.Р. Glick [147] было описано выделение, идентификация и характеристика бактериальных эндофитов, продуцирующих цитокининоподобные молекулы. Было показано, что этилацетатный экстракт культуральных сред микроорганизмов *Pseudomonas resinovorans* и *Paenibacillus polymyxa* обладает выраженными ростостимулирующими свойствами при инокуляции семядолей огурца [38]. Можно предположить, что наблюдаемый положительный эффект связан с продукцией бактериальных цитокининов.

Одним из ключевых механизмов положительного влияния микроорганизмов на растения является их антагонистическая активность в отношении фитопатогенов [45, 95, 152]. Многочисленные исследования демонстрируют способность различных микроорганизмов продуцировать антибиотики, ферменты и другие метаболиты, эффективно подавляющие развитие болезней растений. Широкий спектр микроорганизмов, проявляющих свойства агентов биологического контроля, представлен в таблице 1.2.1 [163].

Таблица 1.2.1 – Микроорганизмы, продуцирующие антимикробные метаболиты

Микроорганизмы	Механизм биоконтроля	Патоген	Источник
<i>Bacillus velezensis</i>	Синтез внеклеточных ферментов, ингибирует рост мицелия и прорастание спор.	<i>Coniella vitis</i>	[206]
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Синтез липопептидов, проявляющих противогрибковую активность.	<i>R. solani</i>	[106]
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> R47	Ингибирование прорастания спор и синтеза HCN грибковыми патогенами.	<i>Phytophthora infestans</i>	[121]
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Синтез сидерофоров и N-ацетил-β-глюкозаминидаза.	<i>F. solani</i>	[158]
<i>Bacillus cereus</i> B 25	Продуцирование хитиназы А и В, гликозидгидролазы, петробактина и бациллибактина, сурфактина.	<i>Fusarium verticillioides</i>	[177]
<i>Gnetum gnemon</i> L.	Синтез антимикробных пептидов.	<i>Ralstonia solanacearum</i>	[129]

Ряд видов ростостимулирующих микроорганизмов, таких как *Bacillus simplex*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. velezensis* и другие, способны продуцировать противогрибковые соединения, а также эффективно конкурировать с грибковыми патогенами за ресурсы [11, 77, 96]. В современной научной литературе отмечается высокая антагонистическая активность бактерий рода *Streptomyces* по отношению к *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *A. niger* и *Fusarium* sp. [132]. Важно отметить, что бактерии рода *Bacillus* продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, обладающих антагонистическими свойствами [63, 109].

Кроме того, конкуренция между микробными сообществами за пространство и питательные вещества является важным механизмом в биологическом контроле фитопатогенов. Например, исследования Sarrocco и др. [205] показали, что эндофитная колонизация корней пшеницы грибом *Trichoderma gamsii* T6085 снижает вероятность заражения растения *Fusarium graminearum* и *Fusarium oxysporum* 7121, поскольку *Trichoderma* является естественным конкурентом для рода *Fusarium*. Francesco и Baraldi [123] сообщили о способности штаммов *Aureobasidium pullulans* конкурировать с грибковым патогеном *Monilinia laxa* за железо за счет продуцирования сидерофоров, что ограничивает распространение патогена в условиях дефицита железа [198].

1.3 Биотехнологически ценные свойства микроорганизмов и перспективы их применения в АПК

Особое внимание уделяется способности микроорганизмов продуцировать фитогормоны – природные вещества, осуществляющие регулирование различных аспектов физиологического и морфологического развития растения на протяжении всего жизненного цикла [79]. К наиболее изученным группам фитогормонов относят ауксины, цитокинины, гиббереллины, этилен, абсцизовую и салициловую кислоты [12, 88].

Ауксины представляют собой важный класс фитогормонов, играющих решающую роль в регуляции различных процессов роста растений. Они синтезируются в корне, в верхушке побега и молодых растущих листьях. Из места биосинтеза ауксины транспортируются базипетально через транспортеры ауксина, которые, в свою очередь, создают градиент ауксина по растению [91]. Ауксины также регулируют синтез других гормонов, таких как стриголактоны, и запускают инициацию зачатков органов [134].

Существует мнение о том, что ауксины ингибируют рост пазушных почек. Однако механизмы роста пазушных почек зависят от соотношения цитокининов и ауксина, а не от абсолютных уровней концентрации любого гормона. Соотношение цитокининов и ауксинов также определяет развитие корней и побегов. Например, при равном содержании данных гормонов клетки сохраняются в недифференцированном состоянии.

Помимо взаимодействия с цитокининами, в литературе сообщается о взаимодействии между ауксинами и другими фитогормонами. Например, отмечено взаимодействие цитокининов с абсцизовой кислотой для регулирования роста корней, с сахаром для регуляции деления, и с брассиностероидами для регулирования дифференциального роста [211].

Способность некоторых бактерий накапливать ауксины (индольные соединения) в культуральных средах после добавления предшественников ауксинов (например, триптофана) была обнаружена с помощью реактива Сальковского [2, 160]. Этот сравнительно простой подход позволил обнаружить способность ряда микроорганизмов синтезировать ауксины [57].

Для подтверждения гипотезы о том, что экзогенные фитогормоны, выделяемые микроорганизмами, способны оказывать положительное влияние на рост и развитие растений, использовали растения с генетически нарушенным транспортом ауксинов. Результаты эксперимента показали, что у растений, неспособных поглощать данный гормон из окружающей среды, усиление роста при обработке бактериальными штаммами не наблюдалось. При этом контрольная группа растений, способная поглощать ауксины, демонстрировала усиленный рост [41, 157].

Современные методы исследования, включающие изучение специфических маркеров развития клеток, а также применение генетических и фармакологических подходов, позволили установить важную роль ауксин-опосредованного транспорта ризобактериями в формировании архитектуры корневой системы модельного растения *Arabidopsis thaliana* (L.). [230]. Формирование корневой системы представляет собой сложный процесс, включающий этапы удлинения и ветвления, регуляция которых осуществляется различными фитогормонами [54]. Ауксины, известные своей способностью интенсифицировать клеточное деление, в некоторых случаях могут ингибировать удлинение корня при экзогенном внесении [42].

Несмотря на это, научные данные подтверждают способность ауксин-продуцирующих бактерий стимулировать рост растений. Важно отметить, что низкие концентрации данных фитогормонов играют ключевую роль в стимуляции удлинения корней [46]. Способность микроорганизмов-продуцентов ауксинов стимулировать ветвление корней также нашла научное подтверждение, хотя регистрация этого показателя роста в лабораторных условиях представляет собой более сложную задачу, чем измерение длины корня [200].

Влияние экзогенных ауксинов распространяется не только на рост корней, но и на развитие побегов. Следует отметить, что влияние микробных ауксинов на рост побегов в современной литературе освещается менее подробно, что, вероятно, связано с недостаточной изученностью механизмов транспорта данного гормона от корней к побегам по сравнению с транспортом абсцизовой кислоты и цитокининов.

Что касается цитокининов, то подавляющее большинство природных представителей этого класса фитогормонов представляют собой группу адениновых соединений с изопреновой, модифицированной изопреновой или ароматической боковой цепью, присоединенной к аминогруппе. Цитокинины присутствуют как в свободной, так и в связанной с тРНК форме, и играют важную роль в регуляции разнообразных физиологических процессов в растениях.

Исследования показывают, что инициация и рост пазушных почек тесно связаны с уровнем цитокининов в растительных тканях [21]. Растения с дефицитом эндогенных цитокининов демонстрируют морфологические и физиологические изменения,

включая укороченные междоузлия побегов, задержку цветения, снижение количества цветков и уменьшение площади поверхности листьев с недоразвитой сосудистой сетью. Также наблюдается уменьшение апикальных меристем побегов с замедленным делением клеток, усиленный рост корней и увеличение корневой меристемы. Таким образом, изменение уровня эндогенных цитокининов может существенно повлиять на регуляцию вышеупомянутых физиологических процессов и привести к нарушению нормального роста растений [64].

Одним из ключевых аспектов, определяющих рост и развитие растений, является баланс фитогормонов, в том числе цитокининов. Синтез цитокининов в растениях контролируется геном *ipt*, кодирующим фермент изопентенилтрансферазу, который играет важнейшую роль на начальном этапе биосинтеза этих гормонов. Основным местом синтеза изопентенилтрансферазы является апикальная меристема корня, что подчеркивает важность корневой системы в гормональной регуляции растения.

Помимо эндогенных цитокининов, в растениях могут накапливаться экзогенные цитокинины, синтезируемые микроорганизмами. Хотя способность к синтезу цитокининов встречается у меньшего числа штаммов RGP бактерий, чем способность к синтезу ауксинов [53], это может быть связано не с фактической редкостью таких бактерий, а с методическими сложностями в обнаружении цитокининов [119]. Доказано, что экзогенные цитокинины, продуцируемые микроорганизмами, способны накапливаться в тканях растений, оказывая влияние на их гормональный статус. Однако влияние экзогенных цитокининов на растения остается предметом дискуссий и требует дальнейшего, более детального изучения.

Результаты исследований, посвященные инокуляции ризосферы растений цитокининпродуцирующими бактериями, неоднозначны. В ряде работ показано, что такая инокуляция приводит к увеличению биомассы как побегов, так и корневой системы [39]. В то же время другие исследования указывают на возможность дисбаланса роста надземной и подземной частей растений при обработке бактериями, продуцирующими цитокинин, что выражается в снижении соотношения массы корневой системы и побега. Подобно

исследованиям ауксинов, изучение микроорганизмов, продуцирующих цитокинины, предоставляет ценную информацию о механизмах действия этих гормонов на рост корней.

Важно отметить, что бактерии могут способствовать усилению выработки цитокининов самими растениями. Примером этого является *Agrobacterium tumefaciens*, способная переносить и интегрировать часть своей Ti-плазмидной ДНК в геном растения-хозяина. В результате интеграции бактериального гена, кодирующего фермент аденозинфосфат-изопентенилтрансферазу, растение-хозяин приобретает способность к синтезу цитокинина посредством альтернативного пути биосинтеза, что приводит к увеличению продукции этого фитогормона [89].

Гиббереллины – это тетрациклические дитерпеноидные кислоты, которые выполняют ключевые функции в регуляции роста и развития растений [13]. Их действие проявляется в ускорении роста, стимуляции развития побегов и цветения, активизации роста корневой системы, ингибировании дифференциации цветочных почек у древесных растений, регуляции периода покоя вегетативных и репродуктивных почек, а также замедлении процессов старения в различных органах растений. Наблюдаемая карликовость у мутантных растений с дефицитом гиббереллинов, может быть устранена путем обработки экзогенными гиббереллинами, что подтверждает их эндогенную роль в нормальном росте и развитии растений [151].

Биосинтез гиббереллинов у высших растений начинается с циклизации геранилгеранилдифосфата, предшественника C₂₀, который синтезируется в пластидах с использованием изопентенилдифосфата. Этот процесс приводит к образованию *энт*-каурена (*ent*-K) в активно растущих тканях, который впоследствии, посредством серии окислительных реакций, катализируемых цитохромом P450 и 2-оксоглутаратзависимыми диоксигеназами, превращается в гиббереллины [144].

Важно отметить, что гиббереллины продуцируются не только высшими растениями, но и грибами и бактериями. Несмотря на то, что роль синтеза гиббереллинов микроорганизмами до конца не изучена, предполагается, что они

выступают в качестве вторичных метаболитов, способных выполнять функции сигнальных факторов в контексте взаимодействия с растением-хозяином [170].

Первое сообщение о способности бактерий синтезировать гиббереллины было сделано Atzorn и соавторами, которые обнаружили гены, кодирующие гиббереллины GA1, GA4, GA9 и GA20 в гнодобактериальных культурах *Rhizobium meliloti* [111]. Также установлено, что *Azospirillum* sp. способен метаболизировать гиббереллины как *in vitro*, так и *in vivo*, т.е. в условиях ассоциации с высшим растением [101].

В работе Kang и соавторов было показано, что *Acinetobacter calcoaceticus*, продуцирующий гиббереллины и органические кислоты, оказывает стимулирующее воздействие на рост огурца, увеличивая длину побегов, биомассу и содержание хлорофилла в листьях. При этом наблюдалось повышение содержания аминокислот и белка в растениях, обработанных бактериальной культурой [145].

Важную роль в регуляции роста и развития растений играет фитогормон этилен. Этилен – газообразный гормон, участвующий в регуляции многочисленных физиологических процессов в течение всего жизненного цикла растения, включая прорастание семян, развитие корневой системы, рост побегов, образование придаточных корней, опадение листьев и плодов, цветение, определение пола и старение [104].

В отличие от негормональных гормонов, этилен транспортируется внутри растения путем диффузии и синтезируется непосредственно вблизи места своего действия. Он может диффундировать через мембраны соседних клеток, что исключает необходимость в белках-транспортерах [117].

Синтез этилена в растениях происходит в два этапа. На первом этапе S-аденозил-L-метионин преобразуется в 1-аминоциклопропана-1-карбоновую кислоту (АСС) под действием фермента АСС-синтазы. Затем АСС превращается в этилен с помощью фермента АСС-оксидазы. Ферменты, участвующие в этих реакциях, кодируются мультигенным семейством, экспрессия которого зависит от сигналов развития и воздействия факторов окружающей среды, таких как

механические повреждения, затопление, засуха, механическое давление и заражение патогенами [226].

В последнее время все больше внимания уделяется роли микробиоты в регуляции этиленового сигналинга. Микроорганизмы могут влиять на все этапы регуляции этиленового пути, непосредственно синтезируя или разлагая этилен, либо индуцируя его синтез в растении [33, 143].

По данным литературы, более трети культивируемых почвенных бактерий способны продуцировать этилен. Филогенетический анализ этиленобразующих ферментов свидетельствует о том, что множественные пути производства этилена возникли независимо и распространились между различными бактериальными типами посредством горизонтального переноса генов [153, 175, 185].

Кроме того, ризосферные микроорганизмы могут косвенно увеличивать уровень этилена, секретируя ауксины и цитокинины – гормоны, усиливающие экспрессию генов, кодирующих синтез этилена [14].

С другой стороны, микроорганизмы способны снижать уровень этилена, например, посредством продукции АСС-деаминазы. Этот фермент расщепляет АСС, что приводит к снижению концентрации этилена в растениях. Активность АСС-деаминазы была обнаружена как у комменсальных, так и у патогенных микроорганизмов [105].

Абсцизовая кислота (АБК) – фитогормон, играющий ключевую роль в адаптации растений к стрессовым условиям. В ответ на абиотические стрессы (засуха, засоление, экстремальные температуры, воздействие токсикантов) растения интенсивно синтезируют АБК, которая активирует каскад защитных механизмов [43, 218]. Снижение уровня АБК до базального при наступлении благоприятных условий позволяет растению переключиться на процессы роста и развития. Таким образом, регуляция уровня АБК является критически важной для поддержания баланса между защитой и ростом в условиях нестабильной внешней среды [87].

Несмотря на участие АБК в регуляции широкого спектра физиологических процессов [220], традиционно ее рассматривают как ингибитор роста, что обуславливает ее использование в качестве ретарданта при культивировании

растительных тканей *in vitro* [128]. Однако ряд исследований указывает на то, что, хотя экзогенное внесение АБК может подавлять регенерацию побегов, ее комбинация с другими фитогормонами может оказывать стимулирующее действие [86, 210].

Абсцизовая кислота представляет собой сесквитерпеноидную молекулу, состоящую из 15 атомов углерода. Этот фитогормон синтезируется всеми сосудистыми растениями, а также присутствует во мхах, водорослях, включая цианобактерии [79]. В настоящее время известно о двух путях синтеза АБК. В растениях АБК синтезируется каротиноидным, или «непрямым» путем, который инициируется расщеплением β -каротина (предшественника С40). Важно отметить, что предшественники β -каротина, такие как изопентенилпирофосфат, фарнезилдифосфат и геранилгеранилдифосфат, также являются предшественниками других фитогормонов, а именно цитокининов, brassinosteroidов и gibberellinов [52].

«Прямой» путь синтеза АБК характерен для некоторых микроорганизмов и представляет собой мевалонатный путь, осуществляемый посредством трансформации промежуточных продуктов, содержащих не более 15 атомов углерода [110, 224].

Применение микроорганизмов, способных синтезировать АБК, открывает перспективы для интенсификации роста растений в условиях стресса. Например, в работе Raheem Shahzad и соавторов было показано, что эндофитный штамм *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 проявляет ростостимулирующую активность у растений в условиях засоления, продуцируя ряд фитогормонов, включая АБК. Данное исследование подтверждает гипотезу о синергическом эффекте экзогенной АБК с другими фитогормонами (в частности, gibberellinами) в стимуляции роста. Кроме того, перспективным направлением является поиск и изучение эндофитных микроорганизмов-продуцентов АБК, учитывая, что у растений синтез этого фитогормона преимущественно происходит в тканях листьев с последующим транспортом в другие органы [156].

Салициловая кислота (СК) – важный растительный гормон, ключевая функция которого заключается в активации защитных реакций растения-хозяина в ответ на заражение патогенами [149].

СК является эндогенным веществом, активно синтезируемым в растительных тканях. Однако важно отметить, что первый путь биосинтеза этого фитогормона был обнаружен у бактерий рода *Pseudomonas*, где СК играет роль предшественника в продукции сидерофора псевдомонина. Синтез СК по этому пути начинается с хоризмата, который преобразуется в изохоризмат под действием изохоризмат-синтазы [138, 227].

У некоторых растений секреция СК осуществляется альтернативным путем, опосредованным ферментом фенилаланин-аммиаклиазой (ФАЛ). Этот фермент катализирует превращение фенилаланина в транскоричную кислоту и идентифицирован у многих видов растений. В большинстве случаев ФАЛ способна катализировать исключительно данную реакцию. Тем не менее, этот фермент является одним из первых этапов синтеза не только СК, но и других защитных соединений [70].

Важно подчеркнуть, что экзогенная СК, в том числе секретируемая ризосферными бактериями, способна оказывать защитное действие на растения, аналогично эндогенной СК. Например, внесение экзогенной СК в листья табака приводило к индуцированию белков, связанных с патогенезом (PR-белков), что повышало устойчивость растения к вирусу табачной мозаики [98, 176]. Применение экзогенной СК и ее функциональных аналогов, таких как аспирин, 2,6-дихлоризоникотиновая кислота и S-метилловый эфир бензотиадиазола, активирует экспрессию генов PR-белков и устойчивость к вирусным, бактериальным и грибковым патогенам у различных двудольных растений [94].

Таким образом, микроорганизмы, способные синтезировать фитогормоны, в частности СК, обладают потенциалом для интенсификации роста и развития растений, снижения негативного воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды и биотических стрессов. Это делает их перспективными

кандидатами для использования в стратегиях устойчивого сельского хозяйства, направленных на повышение урожайности и качества зерна пшеницы.

Сидерофоры представляют собой органические соединения с низкой молекулярной массой, продуцируемые микроорганизмами и растениями в условиях дефицита железа. Функциональная роль сидерофоров заключается в хелатировании трехвалентного железа (Fe(III)) из окружающей среды, что обеспечивает его доступность для микробных и растительных клеток [225]. Данные соединения, представляющие собой металл-хелатирующие агенты, играют важную роль в мобилизации железа и других микроэлементов (Mo, Mn, Co, Ni) из почвы, тем самым способствуя их усвоению растениями и микроорганизмами.

Существует классификация сидерофоров, основанная на их структурных особенностях и выделяющая три основных семейства: гидроксаматы, катехолаты и карбоксилаты. Различия в химической структуре обуславливают различные константы устойчивости комплексов с Fe(III). Например, гидроксаматы образуют комплекс 1:1 с константой устойчивостью, близкой к Fe(III)–ЭДТА (1030), в то время как катехолаты и карбоксилаты формируют более прочные комплексы, сравнимые с Fe(III)–EDDHA (1040). На образование комплексов Fe(III)–сидерофор оказывает влияние pH среды, что связано с конкуренцией за лиганды сидерофора между ионами водорода и железа. Кроме того, Fe(III) конкурирует за связывание с сидерофорами с ионами других металлов (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Al^{3+} , Th^{4+} , U^{4+} , Pu^{4+}), что может влиять на подвижность данных металлов в окружающей среде [47, 193].

В настоящее время сидерофоры рассматриваются не только как факторы, обеспечивающие питание растений и микроорганизмов железом, но и как перспективные агенты биоконтроля, биосенсоры, а также средства биоремедиации и хелатирования, активно участвующие в выветривании почвенных минералов и стимулирующие рост растений [34].

Железо является незаменимым микроэлементом, необходимым для нормального роста и развития растений [23, 162]. В условиях дефицита железозлаковые культуры (ячмень, пшеница) используют эффективную стратегию

мобилизации железа из труднорастворимых соединений [22]. Данная стратегия основана на выделении в ризосферу специфических Fe(III)-хелатирующих соединений, известных как фитосидерофоры, образующих прочные комплексы с Fe(III) [36]. Фитосидерофоры, представляющие собой гексадентатные лиганды, координируют Fe(III) с участием amino- и карбоксильных групп [201]. Образовавшийся комплекс Fe(III)-фитосидерофор транспортируется через плазматическую мембрану клеток корня [46, 74].

Среди бактериальных сидерофоров наиболее распространены катехолаты (например, энтеробактин), однако встречаются также карбоксилаты (ризобактин) и гидроксаматы (ферриоксамин В) [36]. Сидерофоры грибов, как правило, представлены гидроксаматами, относящимися к семейству феррихромов (феррихром), подразделяющихся на пять групп в зависимости от строения боковой цепи гидроксаматной группы [47].

Предложено два основных механизма, посредством которых растения могут усваивать железо из микробных сидерофоров:

1. Восстановление Fe(III)-сидерофоров в апопласте корня: Микробные сидерофоры, обладающие высоким окислительно-восстановительным потенциалом, способны восстанавливаться, высвобождая Fe(II), который затем транспортируется в клетки растения посредством специфических переносчиков. Предполагается, что Fe(III)-сидерофоры, продуцируемые микроорганизмами, транспортируются в апопласт корня, где происходит их восстановление. Образовавшийся Fe(II) накапливается в апопласте, создавая повышенные концентрации железа вблизи корневых клеток.

2. Лигандный обмен между микробными сидерофорами и фитосидерофорами: Микробные сидерофоры способны связывать Fe(III) в почве и затем участвовать в лигандном обмене с фитосидерофорами, продуцируемыми самими растениями. Эффективность этого механизма зависит от множества факторов, включая константы стабильности комплексов, концентрации как микробных, так и фитосидерофоров, pH и окислительно-восстановительные условия ризосферы.

Значимость сидерофоров не ограничивается лишь обеспечением растений железом. Сидерофоры, продуцируемые ризобактериями, рассматриваются как экологически безопасная альтернатива химическим пестицидам [16].

Известно, что различные виды *Pseudomonas* способны стимулировать рост растений и защищать их от патогенов благодаря продукции сидерофоров, таких как пиовердин [54]. Помимо *Pseudomonas*, другие бактерии, например, *Azadirachta indica*, также продуцируют ферриоксамины, способствуя питанию растений железом, росту корней и побегов [199].

Роль сидерофоров в механизмах биологического контроля была убедительно продемонстрирована Клоппером и его коллегами. Многочисленные исследования посвящены участию сидерофоров в биоконтроле фитопатогенов. Установлено, что пиовердин, продуцируемый *Pseudomonas*, контролирует увядание картофеля, вызываемое *Fusarium oxysporum*, а также участвует в биоконтроле *Gaeumannomyces graminis*, патогена, снижающего урожайность пшеницы и ячменя. Помимо *Pseudomonas*, другие бактерии также проявляют биоконтрольные свойства благодаря продукции сидерофоров. Например, сидерофоры, продуцируемые *Bacillus subtilis*, играют важную роль в биоконтроле *F. oxysporum*, вызывающего фузариозное увядание перца [214]. Сидерофоры, продуцируемые *A. indica*, обладают высоким сродством к хелатированию Fe(III) из почвы, тем самым ограничивая развитие некоторых грибковых патогенов.

В контексте повышения продуктивности пшеницы и устойчивости к биотическим стрессам, применение микроорганизмов, обладающих биотехнологически ценными свойствами, представляет собой перспективное направление исследований. Синтез сидерофоров, рассмотренный ранее, является лишь одним из механизмов, посредством которого микроорганизмы могут оказывать положительное влияние на питание растений. Наряду с этим, существенное значение имеет способность некоторых бактерий к фиксации атмосферного азота [9, 18, 19, 67], что напрямую влияет на обеспечение растений доступным азотом, являющимся ключевым элементом питания [135].

Атмосферный азот (N_2) представляет собой огромный резервуар этого элемента, однако в газообразной форме он недоступен для большинства растений [24, 71]. Преобразование молекулярного азота в формы, усваиваемые растениями, осуществляется благодаря микроорганизмам, продуцирующим фермент нитрогеназу [76]. Данный металлофермент катализирует процесс восстановления N_2 до аммиака, делая азот доступным для включения в биохимические процессы растений.

Нитрогеназа широко распространена среди бактерий и архей, обеспечивая им конкурентное преимущество в условиях дефицита биодоступного азота. Различают три основных типа нитрогеназ, отличающихся металлическим кофактором: железо-железо (FeFe), ванадий-железо (VFe) и молибден-железо (MoFe) нитрогеназы [4]. Различные микроорганизмы могут продуцировать разные типы и количества этих ферментов. Например, почвенная бактерия *Azotobacter vinelandii* кодирует все три типа нитрогеназ, в то время как другие микроорганизмы, такие как *Trichodesmium* spp., содержат только MoFe-нитрогеназу [74]. Важно отметить, что концентрация металлов-кофакторов нитрогеназ, особенно ванадия, в окружающей среде может быть лимитирующим фактором для азотфиксации.

Процесс фиксации азота, осуществляемый микроорганизмами, представляет собой сложный биохимический механизм [6]. Переносчик электронов (ферредоксин) восстанавливает белок железа, что приводит к снижению каталитической активности. Для поддержания активности фермента необходимо, чтобы железо и каталитические белки диссоциировали и реассоциировали [46], что делает процесс энергозатратным. На фиксацию одной молекулы азота расходуется до 16 молекул АТФ₂₀. Это подчеркивает важность оптимизации условий для азотфиксации с целью повышения эффективности использования микроорганизмами энергетических ресурсов.

Активность нитрогеназ ингибируется кислородом. В связи с этим, кислородные фототрофы, такие как *Trichodesmium* spp., *Crocospaera watsonii* и *Nodularia* spp., пространственно (в гетероцистах) или временно разделяют процессы фиксации азота и фотосинтеза. Даже нефотосинтезирующие организмы, обитающие в аэробных условиях, должны обладать механизмами защиты нитрогеназы от кислорода, такими

как детоксикация с помощью супероксиддисмутазы и конформационные изменения нитрогеназы. Несмотря на продолжающиеся исследования, существование иных, нечувствительных к кислороду путей фиксации азота в настоящее время не подтверждено [10, 67, 166].

Хотя эукариоты, способные к фиксации азота, не обнаружены, многие азотфиксирующие микроорганизмы вступают в симбиотические отношения с эукариотами [72]. Так, в морской среде ключевую роль в фиксации азота играет цианобактерия *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* (UCYN-A), живущая в симбиозе с одноклеточными водорослями-гаптофитами (например, *Braarudosphaera bigelowii*) [215]. Симбиотические азотфиксирующие микроорганизмы также входят в состав микробиоты кишечника животных, таких как термиты, и могут быть обнаружены в бактериоцитах двустворчатых моллюсков. Особое значение имеет симбиоз азотфиксирующих бактерий отряда Rhizobiales с бобовыми культурами (люцерна, фасоль, горох, соя), образующими корневые клубеньки, которые обеспечивают до 20 % мирового потребления пищевого белка [30, 31]. Изучение механизмов симбиоза и оптимизация условий для его протекания представляет собой важную задачу для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Микроорганизмы играют существенную роль в обеспечении растений фосфором, элементом, лимитирующим продуктивность многих агроэкосистем. В естественных условиях фосфор преимущественно находится в почве в составе органических остатков, доля которых может достигать 90 % от общего содержания этого элемента. В таком виде фосфор недоступен для растений, что обуславливает необходимость его минерализации для обеспечения эффективного поглощения корневой системой [127].

Процесс минерализации фосфора катализируется внеклеточными фосфатазами, которые продуцируются как микроорганизмами, так и растениями. Важно отметить, что, в то время как микроорганизмы способны синтезировать как кислые, так и щелочные фосфатазы, растения продуцируют исключительно кислые

формы ферментов. Это подчеркивает важную роль микроорганизмов в мобилизации фосфора в широком диапазоне pH.

Фосфат-мобилизирующие бактерии (ФМБ) представляют собой группу ростостимулирующих микроорганизмов (PGPR), способных повышать доступность фосфора для растений посредством солюбилизации и минерализации органических соединений. Использование ФМБ для обработки почвы рассматривается как перспективный подход к повышению эффективности применения фосфорных удобрений в сельскохозяйственном производстве. Многочисленные исследования продемонстрировали способность представителей родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Rhizobium* интенсифицировать рост и развитие растений в условиях дефицита фосфора [159].

Выделяют 3 механизма воздействия микроорганизмов на соединения фосфора:

1. Катализ гидролиза органических соединений фосфора посредством высвобождения фосфатаз. Этот процесс позволяет высвобождать фосфор из органических соединений, делая его доступным для растений.

2. Растворение связанного неорганического фосфора за счет синтеза органических кислот, которые снижают pH ризосферы. Органические кислоты, а также бикарбонаты, карбоксилаты и другие биотически высвобождаемые анионы, способны действовать как обменные лиганды, способствуя высвобождению фосфора из нерастворимых соединений.

3. Синергическое взаимодействие с другими полезными микроорганизмами [114]. ФМБ могут взаимодействовать с другими микроорганизмами в ризосфере, усиливая мобилизацию фосфора и способствуя более эффективному питанию растений.

Несмотря на общепризнанную значимость ферментативного расщепления органических фосфоросодержащих остатков микроорганизмами в условиях ограниченного фосфора, этот аспект до сих пор остается недостаточно изученным. Однако существуют работы, подтверждающие его важность. Так, Kaur и Reddy [159] продемонстрировали, что инокуляция пшеницы и кукурузы штаммами *Pantoea cypripedii* и *Pseudomonas plecoglossicida* приводила к улучшению роста

растений, которое сопровождалось увеличением активности фосфомоноэстеразы, фитазы и дегидрогеназы в почве.

Важно учитывать, что коммерческие препараты на основе микроорганизмов содержат различные компоненты, которые также могут влиять на микробную минерализацию фосфора. Для исключения влияния этих факторов D. Nassal с соавторами [127] проводили исследования с использованием чистой культуры *Pseudomonas* sp. RU47, а также термически обработанных культур (для определения косвенных механизмов трансформации фосфора). Результаты показали, что оба варианта обработки способствовали интенсификации роста томатов, что было связано с повышением содержания фосфора в окружающей среде. Таким образом, использование фосфат трансформирующих микроорганизмов представляет собой перспективный подход к улучшению питания растений в агроэкосистемах.

Многие ризобактерии способны высвобождать калий из нерастворимых силикатных минералов, таких как иллит и полевои шпат. Этот процесс солюбилизации достигается за счет выделения хелатирующих органических кислот, таких как лимонная, винная и щавелевая [86]. Исследования X.F. Sheng, L.Y. He [196] показали, что солюбилизация иллита и полевого шпата ризосферными микроорганизмами связана с образованием 2-кетоглюконовой, пропионовой, яблочной, винной, лимонной, щавелевой, глюконовой, янтарной и фумаровой кислот, при этом наиболее эффективными оказались глюконовая, щавелевая, 2-кетоглюконовая и винная кислоты. Аналогичная способность к высвобождению калия из минералов горных пород (слюда, иллит, полевои шпат, ортоклаз) посредством продукции щавелевой, лимонной, фумаровой и винной кислот отмечена у представителей родов *Bacillus* и *Pseudomonas* [26].

Помимо продукции органических кислот [40], микроорганизмы солюбилизируют неорганический калий и другими механизмами, включая продукцию сидерофоров и экзополисахаридов, секрецию фенольных соединений и гуминовых веществ, а также образование комплексов между ионами различных металлов, таких как Ca, Al и Fe [86]. Экзопполисахариды, например, участвуют в солюбилизации путем связывания с металлами [178]. I.P.

Anjanadevi et al. [190] установили, что солюбилизация калия *Bacillus* sp. коррелирует с продукцией экзополисахаридов в культуральной среде.

В целом, микроорганизмы осуществляют трансформацию биогенных веществ в ризосфере, улучшая питание растений и стимулируя их рост и развитие [5]. Инокуляция растений микробными агентами представляет собой перспективный механизм, позволяющий снижать количество вносимых агрохимикатов, что соответствует современным тенденциям органического земледелия [80]. Более того, некоторые метаболиты микроорганизмов не только улучшают питание растений, но и могут быть использованы в качестве агентов биологического контроля и инструментов для восстановления нарушенных территорий [20, 55, 150]. Таким образом, изучение и практическое применение микроорганизмов, обладающих биотехнологически ценными свойствами, является актуальным направлением исследований, способствующим устойчивому развитию сельского хозяйства [8].

1.4 Заключение по литературному обзору

Проведенный анализ литературных источников свидетельствует о возрастающей актуальности темы повышения продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных культур, в частности пшеницы, к абиотическим и биотическим стрессам. В условиях возрастающего антропогенного воздействия и изменения климата, обеспечение продовольственной безопасности требует разработки и внедрения инновационных, экологически безопасных подходов к растениеводству.

Микроорганизмы, в частности ризобактерии, представляют собой перспективный инструмент для достижения этой цели. Обзор литературы показал, что ризобактерии обладают широким спектром полезных свойств, способствующих росту и развитию растений, а также повышению их устойчивости к различным абиотическим и биотическим стрессам.

Ростостимулирующие свойства ризобактерий обусловлены различными механизмами, включая фиксацию атмосферного азота, солюбилизацию фосфатов, синтез фитогормонов, а также индукцию системной устойчивости. Однако эффективность применения ризобактерий в полевых условиях может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как генотип растения, условия окружающей среды и состав микробного сообщества почвы.

На основании анализа литературных данных сформулирована цель диссертационной работы – теоретическое и экспериментальное обоснование биотехнологических приемов создания биопрепарата на основе новых штаммов ризобактерий для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- отобрать ризобактерии зерновых культур, проявляющие устойчивость к стрессовым факторам (агрохимикатам, высокой степени засоления) и способные эффективно развиваться на средах с ограниченным содержанием питательных веществ, что обеспечит их применение в различных условиях культивирования;
- провести скрининг перспективных ризобактерий, оценивая их способность продуцировать фитогормоны, фиксировать атмосферный азот, солюбилизировать фосфаты, проявлять антиоксидантную и антагонистическую активность в отношении фитопатогенов;
- установить видовую и родовую принадлежность отобранных ризобактерий;
- сконструировать консорциумы на основе биосовместимых штаммов ризобактерий, проявляющих синергетический эффект; исследовать влияние перспективных составов консорциумов на показатели развития модельной культуры (яровой мягкой пшеницы) в лабораторных условиях; определить генетический потенциал ризобактерий, входящих в состав отобранного консорциума, в части синтеза биоактивных соединений и оценить их цитотоксичность в условиях *in vitro*;
- оптимизировать биотехнологические параметры культивирования разработанного биопрепарата на основе выбранного консорциума ризобактерий с целью достижения максимальной эффективности и стабильности;
- оценить экономическую целесообразность производства биопрепарата.

ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе рассмотрены объекты и методы исследования, используемые материалы, реактивы и оборудование, для достижения целей, связанных с разработкой биопрепарата на основе ризобактерий, устойчивых к антибиотическим стрессам и обладающих комплексом биотехнологически ценных свойств.

2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента

Теоретические и экспериментальные исследования в рамках диссертационной работы выполнены в соответствии с целью и поставленными задачами на кафедре бионанотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет». Общая схема выполнения исследования представлена на рисунке 2.1.1.

Исследования включали три блока – теоретический, экспериментальный и практический. Теоретическая работа заключалась в анализе отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, обосновании цели и постановке задач исследования.

Экспериментальная часть работы состояла из трех последовательных этапов.

Первый этап исследований посвящен поиску и отбору штаммов ризобактерий зерновых культур, устойчивых к действию агрохимикатов, высокой степени засоления, и способных к росту на обедненных питательными компонентами средах. Для выделенных штаммов исследованы культуральные, морфологические и биохимические свойства.

Второй этап посвящен изучению биотехнологически ценных свойств ризобактерий, а именно: оценке антиоксидантной активности, способности



Рисунок 2.1.1 – Схема проведения исследований

продуцировать фитогормоны, солюбилизировать фосфаты, фиксировать азот, проявлять антагонистическую активность в отношении фитопатогенов.

На третьем этапе конструировали консорциумы ризобактерий, оценивая биосовместимость штаммов. По анализу биотехнологически ценных свойств отбирали перспективные составы консорциумов. Оценивали их влияние на рост и развитие модельной культуры (яровой мягкой пшеницы). Для штаммов ризобактерий, входящих в состав отобранного консорциума, провели поиск кластеров биосинтеза вторичных метаболитов.

В рамках практической реализации подобраны рабочие параметры культивирования разработанного биопрепарата, дана экономическая оценка его производства, разработана техническая документация на биопрепарат.

В работе использовались общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований, включающие: эксперименты по отбору микроорганизмов, исследованию их морфологических, культуральных и биохимических свойств, анализу биотехнологически ценных свойств (продуцирование фитогормонов, солюбилизация фосфатов, фиксирование азота, антагонистическая активность) ризобактерий и консорциумов на их основе, подбору параметров культивирования разработанного биопрепарата на ризобактерий. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Microsoft Office Excel 2021. Результаты исследования биотехнологически ценных свойств консорциумов оценивали при помощи анализа ANOVA с апостериорным критерием Шеффе.

2.2 Объекты исследования

На разных этапах исследования объектами являлись:

– семена яровой мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс (рисунок 2.2.1 а) для проведения лабораторной апробации ризобактерий и консорциумов. Сорт включен в

Госреестр по Западно-Сибирскому (10) и Восточно-Сибирскому (11) регионам. Масса 1000 зерен – 35–44 г. Средняя урожайность в Западно-Сибирском регионе – 25,1 ц/га, в Восточно-Сибирском – 23,5 ц/га, на уровне средних стандартов. Максимальная урожайность 61,2 ц/га. Среднеспелый, вегетационный период – 80–99 дней. Устойчивость к полеганию на уровне стандартов. Умеренно устойчив к пыльной головне; умеренно восприимчив к твердой головне и стеблевой ржавчине; восприимчив к септориозу; сильновосприимчив к мучнистой росе, бурой ржавчине и корневым гнилям.



а



б

Рисунок 2.2.1 – Объекты исследования: а – ризосфера яровой мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс, б – семена яровой мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс

- ризосфера яровой мягкой пшеницы Сибирский Альянс (рисунок 2.2.1 б), произрастающая на территории г. Кемерово, для выделения ризобактерий;
- штаммы ризобактерий, выделенные из ризосферы яровой мягкой пшеницы;
- консорциумы ризобактерий;
- разработанный биопрепарат на основе консорциума ризобактерий;
- тест-культуры фитопатогенных грибов зерновых культур для оценки антагонистической активности ризобактерий и консорциумов: *Fusarium*

graminearum F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006 (Биоресурсный центр Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»).

2.3 Используемые материалы, реактивы и оборудование

При выполнении исследований по теме диссертационной работы «Биотехнология получения биопрепарата на основе новых штаммов ризобактерий» использовали следующее сырье, химические реактивы и расходные материалы:

- вода дистиллированная ГОСТ 6709-72;
- спирт этиловый ГОСТ 5962–2013 (Россия, «Кемеровская фармацевтическая фабрика»);
- натрий хлористый, х.ч., ГОСТ 4233-77 (Россия, «ЛенРеактив»);
- натрий гипохлорид, х.ч., ГОСТ 11086-76 (Россия, «ХимКомпонент»);
- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (свободный радикал DPPH), 95 %, (Германия, «Alfa Aesar»);
- кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77 (Россия, «ХимКомпонент»);
- индолил-3-уксусная кислота, х.ч. (Россия, «Диа-М»);
- гиббереллиновая кислота, х.ч. (Россия, «Диа-М»);
- difco M9 minimal salts, 5x (Франция, «Le Pont de Claix»);
- сухой бульон Лурия-Бертани в модификации Миллера (Индия, «HiMedia Laboratories»);
- питательная среда картофельно-глюкозный агар (Россия, «ЛенРеактив»);
- агар микробиологический, ГОСТ 17206-96 (Россия, «ЛенРеактив»);
- хизалофоп-П-этил, х.ч. (Россия, «Лабтех»);
- имидаклоприд, х.ч. (Россия, «Оптимум»);
- метсульфурон-метил, х.ч. (Германия, «HPC Standards»);
- питательная среда колумбийский агар с кровью (Россия, «Хеликон»);
- железо (II) хлорид, х.ч., ГОСТ 11159-76 (Россия, «ЛенРеактив»);

- цинк уксуснокислый, х.ч., ГОСТ 5823-78 (Россия, «ЛенРеактив»);
- калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-75 (Россия, «ЛенРеактив»);
- соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77 (Россия, «ХимБаза»);
- магний сернокислый, х.ч., ГОСТ 4523-77 (Россия, «Chem-eh»);
- калий фосфорнокислый 2-замещенный, ч.д.а., ГОСТ 2493-75 (Россия, «Chem-eh»);
- натрий молибденовокислый, х.ч., ГОСТ 10931-74 (Россия, «ХимРеактив»);
- железо (II) сернокислое, х.ч., ГОСТ 6981-94 (Россия, «ХимРеактив»);
- сахароза, х.ч., ГОСТ 5833-75 (Россия, «Сигма Тек»);
- глюкоза, х.ч., ГОСТ 975-88;
- кальций углекислый, х.ч., ГОСТ 4530-76 (Россия, «ХимРеактив»);
- кальций фосфорнокислый 2-замещенный, х.ч., ГОСТ 3204-76 (Россия, «Chem-eh»);
- марганец (II) сернокислый, х.ч., ГОСТ 435-77 (Россия, «ХимРеактив»);
- железо (III) сернокислое, х.ч., ГОСТ 9485-74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- аммоний сернокислый, х.ч., ГОСТ 3769-78 (Россия, «ХимРеактив»);
- L-триптофан, ч.д.а., (Россия, «Химмед»);
- карбамид (мочевина), х.ч., ГОСТ 6691-77 (Россия, «Chem-eh»);
- иммерсионное масло, ч.д.а., ГОСТ 13739-78 (Россия, «ChemExpress»);
- метиленовый голубой, х.ч., ГОСТ 5801–53 (Россия, «ЛенРеактив»);
- кассеты Gram-Positive identification card (Франция, «Biomérieux»);
- кассеты Gram-negative identification card (Франция, «Biomérieux»);
- фарфоровые чашки, ГОСТ 9147–80 (Россия, «Химмедснаб»);
- стакан химический стеклянный на 50, 100 и 150 мл, ГОСТ 29227–91 (Россия, «ЛенРеактив»);
- пипетки стеклянные на 1, 2, 5 и 10 мл, ГОСТ 29227–91 (Россия, «ЛенРеактив»);
- цилиндры мерные на 25, 50, 100 и 250 мл, ГОСТ 1770–74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- чашки Петри, ГОСТ 25336–82 (Россия, «ХимЛабПрибор»);

- пробирки, ГОСТ 1770–74 (Россия, «ХимЛабПрибор»);
- фильтры бумажные, ТУ 6-09-1678-86 (Россия, «ЛабХимСнаб»);
- стеклянные воронки, ГОСТ 25336–82 (Россия, «Пять Капель»);
- стекло предметное, ГОСТ 9284–75 (Россия, «НВ-Лаб»);
- стеклянная палочка, ГОСТ 21400–75 (Россия, «Химмедснаб»);
- колбы конические на 50, 100, 250 и 500 мл, ГОСТ 25336–82 (Россия, «Химмедснаб»);
- мерные колбы на 25, 50 и 100 мл, ГОСТ 1770–74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- спиртовка лабораторная стеклянная, ГОСТ 25336–82 (Россия, «ЛенРеактив»);
- бактериологическая петля (Россия, ХимМедСнаб);
- фальконы на 15 и 50 мл (Диа-М).

При выполнении исследований использовали следующее научно-исследовательское оборудование:

- бидистиллятор марки ТУ 25–11.1592–81 БС (Россия, «Лабинвест»);
- шкаф сушильный ШСВЛ–80 (Россия, «Касимовский приборный завод»);
- весы электронные (аналитические) ВСЛ 60/0,1А (Россия, «Невские весы»);
- автоматический дозатор на 1 мл (Россия, НВ-Лаб);
- термостат ТСО–1/80 СПУ (Россия, «Смоленское СКТБ СПУ»);
- ламинарный бокс класс 2 тип А БАВп–01–«Ламинар–С»–1,5 (Россия, «Ламинарные системы»);
- шейкер-инкубатор (Shaking Incubator) LSI-3016A/LSI-3016R (Южная Корея, «Daihan Labtech»);
- спектрофотометр UV 1800 (Shimadzu, Япония);
- денситометр Densichek plus (Франция, «BioMerieux»);
- анализатор белкового азота Rapid N Cube (Германия, «Elementar»);
- центрифуга CV-50 (Латвия, «ELMI»);
- аналитические весы AND HR-202 i (Япония, «A&D»);
- термостат ТМ-100 (Россия, ООО «ПЭП «СИБЭКОПРИБОР»);
- центрифуга 5430 (Германия, «Eppendorf»);

- плита нагревательная ПРН-6050-2 (Россия, «Томь Аналит»);
- термостат электрический суховоздушный охлаждающий ТСО–1/80 СПУ (Россия, «Смоленское СКТБ СПУ»);
- микроскоп прямой AxioScope A1 (Германия, «Carl Zeiss AG»);
- анализатор автоматический бактериологический VITEK 2 Compact (Франция, «Biomerieux»);
- персональный мультиканальный биореактор с неинвазивным измерением оптической плотности в реальном режиме времени RTS-8 plus (Латвия, «Biosan»);
- ABI 3130xl Genetic Analyzer (USA, «Applied Biosystems»).

2.4 Методы исследования

Для получения чистых культур ризобактерий яровой мягкой пшеницы Сибирский Альянс, обладающих устойчивостью к абиотическим стрессам (действию агрохимикатов, высокой степени засоления) и способных развиваться на обедненных питательными компонентами средах, применялась следующая методика [58]. На первом этапе проводили выделение ризобактерий, способных развиваться на обедненных питательными компонентами средах. Для этого 1 г ризосферы пшеницы помещали в стерильную пробирку, содержащую 10 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки инкубировали на шейкере-инкубаторе LSI-3016A/LSI-3016R в течение 2 часов при температуре 28 ± 2 °C и перемешивании со скоростью 110 об/мин для выделения микроорганизмов в раствор. Полученную суспензию культивировали на жидкой среде Difco M9 minimal salts, 5x. Инкубацию проводили в шейкере-инкубаторе при температуре 28 ± 2 °C и перемешивании 110 об/мин в течение 72 часов.

На втором этапе выделяли солеустойчивые штаммы. Для этого 5 % от объема полученной суспензии переносили в пробирку, содержащую бульон Лурия-Бертани в модификации Миллера (LB-бульон) с добавлением хлорида натрия (NaCl) в

концентрации 6 г/л. Культивирование осуществляли в шейкере-инкубаторе при температуре 28 ± 2 °C и перемешивании 110 об/мин в течение 72 часов.

Третьим этапом проводили отбор штаммов, устойчивых к действию агрохимикатов. 5 % от объема суспензии, полученной на среде с NaCl, вносили в LB-бульон с добавлением следующих агрохимикатов: хизалофоп-П-этил (3 мл/л), имидаклоприд (3 мл/л) и метсульфурон-метил (3 г/л). Культивирование проводили в тех же условиях, что и на предыдущих этапах [58].

Для получения чистых культур микроорганизмов применяли метод глубинного посева [58]. Для этого 1 мл суспензии, полученной на среде с агрохимикатами, вносили в стерильную чашку Петри и заливали расплавленной агаризованной средой Лурия-Бертани в модификации Миллера (LB-агар). Чашки инкубировали в термостате ТСО–1/80 СПУ при температуре 28 ± 2 °C в течение 48 часов. С целью получения монокультуры проводили пять последовательных пересевов методом истощающего штриха на LB-агар. Полученные чистые культуры хранили на скошенном LB-агаре в холодильнике при температуре 4 ± 2 °C.

Для характеристики выделенных ризобактерий проводили комплексное изучение их морфологических, культуральных и физиолого-биохимических свойств. Для оценки культуральных характеристик готовили суспензию чистых культур низкой концентрации. Посев осуществляли глубинным способом на LB-агар. Инкубацию проводили в термостате при 28 ± 2 °C в течение 24 часов. После инкубации оценивали следующие признаки колоний: цвет, размер, форму, профиль, характер края, фактуру [58]. Для изучения морфологии клеток готовили мазки из чистых культур. Мазки фиксировали на предметном стекле и окрашивали метиленовым голубым. Микроскопирование проводили с использованием светового микроскопа с иммерсионным объективом (x90 или x100) [12]. Определение грампринадлежности осуществляли методом КОН [7]. Для определения биохимических свойств использовали автоматический микробиологический анализатор Vitek 2 Compact с использованием карт ID-GN (для грамотрицательных микроорганизмов) и ID-GP (для грамположительных микроорганизмов). Для подготовки к анализу культуры выращивали на колумбийском агаре в течение 48

часов при 28 ± 2 °С, затем готовили суспензию штаммов с плотностью по МакФарланду в пределах 2,70–3,30 с помощью денситометра Densichek plus [124].

Ростостимулирующие свойства ризобактерий оценивали по активности культуральной жидкости (КЖ) в соответствии с соответствующими методами исследования антиоксидантной активности, способности продуцировать фитогормоны и фиксировать атмосферный азот. Для получения КЖ готовили суспензию исследуемых культур в 2 мл дистиллированной воды, доводя оптическую плотность до 0,8–1,0 по шкале МакФарланда с помощью денситометра. Затем 1 мл суспензии добавляли в 10 мл LB-бульона. Культивирование проводили на шейкере-инкубаторе в течение 48 часов при температуре 28 ± 2 °С и перемешивании 110 об/мин. По окончании инкубации суспензию центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 минут для отделения клеток от КЖ [58]. Полученная КЖ использовалась для оценки ростостимулирующих свойств ризобактерий, а также влияния на морфометрические показатели яровой мягкой пшеницы в лабораторной апробации.

Антиоксидантную активность культуральной жидкости ризобактерий определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH), по модифицированной методике, описанной A. Buatong et al. [187]. Для проведения анализа к 1 см³ культуральной жидкости добавляли 3 см³ рабочего раствора DPPH (0,079 г/л DPPH в 96 % этаноле). Полученную смесь тщательно перемешивали и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут для завершения реакции. По истечении указанного времени проводили измерение оптической плотности (ОП) полученного раствора на спектрофотометре UV 1800 при длине волны 517 нм. В качестве контрольных образцов использовали питательную среду с 96 % спиртом (K₁) и питательную среду с реактивом DPPH (K₂), соотношения реактивов 1:3. Антиоксидантную активность (АОА) рассчитывали по формуле 2.4.1.

$$AOA = \left(1 - \frac{(OP_{об} - OP_{к1})}{OP_{к2}}\right) \times 100 \%, \quad (2.4.1)$$

где АОА – антиоксидантная активность, %;

ОП_{об} – оптическая плотность образца;

ОП_{к1} – оптическая плотность питательной среды с 96 % этанолом;

ОП_{к2} – оптическая плотность питательной среды с реактивом DPPH;

100 % – пересчет на проценты.

Для количественной оценки продукции индолил-3-уксусной кислоты ризобактериями использовали колориметрический метод с реактивом Сальковского. К 1 см³ культуральной жидкости добавляли 1 см³ реактива Сальковского (0,1 г хлорида железа трехвалентного, растворенного в 100 см³ 50 % серной кислоты). Смесь инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. После инкубации измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 535 нм. Концентрацию синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты определяли по предварительно построенному калибровочному графику для стандартного раствора ИУК (диапазон концентраций от 1 до 40 мг/мл) [186].

Определение синтеза гиббереллиновой кислоты, продуцируемой ризобактериями, определяли спектрофотометрическим методом. К 2 см³ культуральной жидкости последовательно добавляли 280 мкл 1 М раствора ацетата цинка и 280 мкл 10,6 % раствора ферроцианида III калия. Полученную смесь тщательно перемешивали. Далее проводили центрифугирование при 4500 об/мин в течение 10 минут. После центрифугирования супернатант смешивали с 30 % соляной кислотой в соотношении 1:1. Полученную смесь выдерживали в течение 75 минут. В качестве контрольного образца использовали питательную среду, с которой проводили аналогичные манипуляции. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре при длине волны 254 нм относительно 5 % раствора соляной кислоты. Концентрацию синтезируемой гиббереллиновой кислоты определяли по предварительно построенному калибровочному графику

для стандартного раствора ГК (диапазон концентраций от 10 до 200 мкг/мл) [126].
Оптическую плотность образца рассчитывали по формуле 2.4.2:

$$ОП = ОП_{п} - ОП_{к}, \quad (2.4.2)$$

где ОП – искомая оптическая плотность образца;

ОП_п – оптическая плотность образца, по показаниям прибора;

ОП_к – оптическая плотность контроля.

Для установления способности ризобактерий фиксировать атмосферный азот использовали модифицированную методику А. Cordova-Rodriguez et al. [201]. Предварительно подготовленную бактериальную суспензию в количестве 1 см³ вносили в колбы, содержащие 10 см³ жидкой питательной среды следующего состава (г/л): сахара – 20,0; магний сернокислый – 5,0; калий фосфорнокислый 2-замещенный – 1,0; натрий молибденовокислый – 0,005; натрий хлористый – 5,0; железо (II) сернокислое – 0,01; кальций углекислый – 2,0. Культивирование проводили в термостатируемом шейкере при температуре 28±2 °С и интенсивности перемешивания 110 об/мин в течение 48 ч. По истечении инкубационного периода клетки отделяли от культуральной жидкости методом центрифугирования при 8000 об/мин в течение 30 минут. Содержание общего азота в культуральной жидкости определяли инструментальным методом с использованием анализатора Rapid N Cube [122].

Способность исследуемых бактерий к солюбилизации труднорастворимых фосфатов оценивали визуально и количественно. Для визуальной оценки суточную культуру исследуемых штаммов наносили точечным посевом на агаризованную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20; марганец сернокислый – 0,01; кальций фосфорнокислый – 5; натрий хлористый – 0,2; железо (III) сернокислое – 0,01; магний сернокислый – 0,1; агар-агар – 15. Посевы инкубировали в термостате при температуре 28±2 °С в течение 4 суток [188]. Количественную оценку эффективности солюбилизации фосфатов (Эф_{сф}) проводили путем измерения

диаметра колонии и зоны просветления вокруг колонии с последующим расчетом индекса солюбилизации по формуле 2.4.3:

$$\text{Эф}_{\text{сф}} = \frac{D_{\text{к+а}}}{D_{\text{к}}} \times 100 \%, \quad (2.4.3)$$

где $\text{Эф}_{\text{сф}}$ – индекс солюбилизации фосфата, %;

$D_{\text{к+а}}$ – диаметр колонии вместе с ареолом, см;

$D_{\text{к}}$ – диаметр колонии, см.

С целью выбора перспективных штаммов ризобактерий проводили ранжирование по комплексу показателей, характеризующих их ростостимулирующие свойства. Значимость каждого показателя представлена в таблице 2.4.1, а балльная оценка – в таблице 2.4.2.

Таблица 2.4.1 – Значимость ростостимулирующих показателей ризобактерий

Показатель	Значимость
Антиоксидантная активность (АОА)	0,05
Синтез индолил-3-уксусной кислоты (ИУК)	0,4
Синтез гиббереллиновой кислоты (ГК)	0,35
Фиксация азота (N)	0,1
Солюбилизация фосфора (P)	0,1

Таблица 2.4.2 – Баллы ростостимулирующих показателей ризобактерий

Показатель	Балл				
	1	2	3	4	5
АОА, %	1–10	11–30	31–60	61–80	81–90
Синтез ИУК, мг/мл	1,0–2,0	2,1–4,0	4,1–8,0	8,1–10,0	10,1–11,0
Синтез ГК, мкг/мл	1–50	51–150	151–350	351–450	451–500
Фиксация N, мкг/л	1–100	101–200	201–550	551–750	751–850
Солюбилизация P, %	100–120	121–160	161–250	251–330	331–350

Для оценки способности ризобактерий подавлять рост фитопатогенов определяли их антагонистическую активность в отношении следующих тест-культур: *Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006.

Фитопатогенные грибы предварительно культивировали на картофельно-глюкозном агаре в пробирках. Суточную культуру исследуемых ризобактерий, выращенную в бульоне LB, засевали глубинным способом в чашки Петри с агаризованной средой LB и инкубировали при температуре 28 ± 2 °C в течение 24 ч. После инкубации из агаризованной среды с выросшими ризобактериями вырезали агаровый блок и помещали его в лунку, сформированную в агаровом диске другой чашки Петри, предварительно засеянной тест-культурой фитопатогена. Посев фитопатогенных грибов осуществляли поверхностным методом «газона», используя смыв со скошенного агара. Плотность суспензии составляла 0,5 по шкале МакФарланда ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/см³). Чашки Петри помещали в холодильник при температуре 5 °C на 8 часов для диффузии метаболитов, продуцируемых ризобактериями, в агаризованную среду. Затем посеы инкубировали в термостате при температуре 26 ± 2 °C [3]. Учет результатов проводили путем измерения диаметра зоны подавления роста фитопатогена вокруг агарового блока с ризобактериями.

Для отбора перспективных штаммов ризобактерий, проявляющих антагонистическую активность, проводили ранжирование по степени их воздействия на фитопатогенные грибы. В качестве критериев использовали диаметр зоны ингибирования роста следующих патогенов: *Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529 и *Botrytis cinerea* F-1006. Значимость каждого патогена при ранжировании определялась исходя из его распространенности и вредоносности для пшеницы в регионе исследования (таблица 2.4.3). Для каждого штамма ризобактерий, в зависимости от диаметра зоны ингибирования роста патогена, присваивался балл согласно шкале, представленной в таблице 2.4.4.

Таблица 2.4.3 – Значимость показателей антагонистической активности

Показатель	Значимость
<i>Fusarium graminearum</i> F-877	0,5
<i>Bipolaris sorokiniana</i> F-529	0,3
<i>Botrytis cinerea</i> F-1006	0,2

Таблица 2.4.4 – Баллы показателя антагонистической активности

Показатель	Балл				
	1	2	3	4	5
Диаметр зоны ингибирования, см	1,1–2,0	2,1–4,0	4,1–6,5	6,6–8,5	8,5–9,5

Для отобранных по результатам ранжирования ризобактерий проводили определение видовой принадлежности. Идентификацию осуществляли секвенированием гена 16S рРНК в Биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с применением праймеров 16S_8f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 16S_926r (CCTTCATTCCTTTRAGTTT). Продукты ПЦР секвенировали на автоматическом секвенаторе AE3000. Видовую принадлежность устанавливали путем поиска ближайшего гомолога с использованием программы Blast и базы данных NCBI Reference Sequence Database.

При формировании бактериальных консорциумов проводили оценку биосовместимости ризобактерий методом совместного культивирования на агаризованной среде LB. На поверхность среды ровным слоем наносили тест-культуру, а в лунки диаметром 4 мм вносили культуральную жидкость исследуемых штаммов. Чашки Петри инкубировали при температуре 28 ± 2 °C в течение 24 ч. Отсутствие зоны ингибирования роста вокруг лунки указывало на биосовместимость микроорганизмов. Для создания консорциумов готовили чистые культуры в бульоне LB, доводя оптическую плотность до 0,8–1,0 по шкале МакФарланда с использованием денситометра. Культивирование проводили в течение 48 ч при 28 ± 2 °C и 110 об/мин. Далее в пробирки с бульоном LB вносили суспензию каждого штамма в количестве 5 % от общего объема среды.

У полученных консорциумов определяли следующие показатели: количество синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты и гиббереллиновой кислоты, антиоксидантную и антагонистическую активность, а также способность к фиксации азота. Определение проводили по методикам, описанным ранее для ризобактерий.

Для отбора перспективных бактериальных консорциумов, обладающих наилучшими ростостимулирующими свойствами и антагонистической активностью, проводили ранжирование по комплексу показателей. Значимость каждого показателя при ранжировании определялась исходя из его вклада в повышение устойчивости пшеницы к биотическому стрессу и стимуляции роста растений (таблица 2.4.5). Балл присваивался согласно шкале (таблице 2.4.6).

Таблица 2.4.5 – Значимость показателей ростостимулирующих свойств консорциумов

Показатель	Значимость
АОА	0,05
Синтез ИУК	0,2
Синтез ГК	0,1
Фиксация азота	0,05
<i>Fusarium graminearum</i> F-877	0,25
<i>Bipolaris sorokiniana</i> F-529	0,20
<i>Botrytis cinerea</i> F-1006	0,15

Таблица 2.4.6 – Баллы показателей ростостимулирующих свойств консорциумов

Показатель	Балл				
	1	2	3	4	5
АОА, %	80–81,0	81,1–83,0	83,1–86,0	86,1–88,0	88,1–89,0
Синтез ИУК, мг/мл	5,0–6,0	6,1–7,0	7,1–11,0	11,1–13,0	13,1–14,0
Синтез ГК, мкг/мл	400–450	451–550	551–800	801–900	901–950
Фиксация азота, мкг/л	600–620	621–670	671–880	881–930	931–950
АГА, см	1,1–2,0	2,1–4,0	4,1–6,5	6,6–8,5	8,5–9,5
при отрицательной разнице между значением показателя у консорциума и средней величиной этого показателя по ризобактериям, консорциуму присваивается «0» баллов					

Для оценки эффективности применения перспективных бактериальных консорциумов, отобранных по результатам ранжирования, проводилась серия лабораторных экспериментов по оценке влияния ризобактерий на устойчивость модельной культуры (яровой мягкой пшеницы) к биотическому стрессу. Перед посевом семена подвергали предварительной стерилизации с целью минимизации влияния поверхностной микрофлоры. Стерилизацию осуществляли путем обработки семян в 5 % растворе гипохлорита натрия в течение 10 минут. После обработки семена

пятикратно промывали стерильной дистиллированной водой для удаления остатков дезинфицирующего раствора и подсушивали в течение 2 часов в стерильных условиях ламинарного бокса для предотвращения контаминации. Часть подготовленных семян подвергалась инфицированию фитопатогеном с целью моделирования биотического стресса. Инфицирование осуществляли путем обработки семян в суспензии фитопатогена с оптической плотностью, соответствующей 0,3 по шкале МакФарланда, в течение 2 часов с последующей просушкой в стерильных условиях.

Бактериальную суспензию для обработки семян готовили на основе стерильного физиологического раствора. Концентрацию бактерий в суспензии доводили до оптической плотности, соответствующей 1,5 по шкале МакФарланда, после чего суспензию разводили стерильной водой в соотношении 1:50.

Посев семян осуществляли в вегетационные сосуды объемом 0,2 л, помещая в каждый сосуд по 10 семян. После посева почву увлажняли путем полива дистиллированной водой (в контрольном варианте) или суспензией микроорганизмов из расчета 25 см³ на 100 г почвы. Дальнейшую инкубацию проростков осуществляли в климатической камере при контролируемых условиях: температуре 25 °С и относительной влажности 40 % [131]. Схема эксперимента и варианты обработки семян представлены в таблице 2.4.7.

Таблица 2.4.7 – Варианты обработки семян яровой мягкой пшеницы

Опыт	Описание
Вариант 1.1	Контроль
Вариант 1.2	Обработка фитопатогеном
Вариант 2.1	Обработка штаммом № 24
Вариант 2.2	Обработка штаммом № 31
Вариант 2.3	Обработка штаммом № 35
Вариант 2.4	Обработка штаммом № 36
Вариант 3.1	Обработка консорциумом № 4
Вариант 3.2	Обработка консорциумом № 9
Вариант 3.3	Обработка консорциумом № 10
Вариант 4.1	Обработка штаммом № 24 и фитопатогеном
Вариант 4.2	Обработка штаммом № 31 и фитопатогеном

Продолжение таблицы 2.4.7

Опыт	Описание
Вариант 4.3	Обработка штаммом № 35 и фитопатогеном
Вариант 4.4	Обработка штаммом № 36 и фитопатогеном
Вариант 5.1	Обработка консорциумом № 4 и фитопатогеном
Вариант 5.2	Обработка консорциумом № 9 и фитопатогеном
Вариант 5.3	Обработка консорциумом № 10 и фитопатогеном

На 11 сутки после посева проводили оценку следующих показателей: всхожесть семян, длину проростка и корня, содержание каротиноидов, хлорофилла а и b. Всхожесть семян определяли по формуле 2.4.4:

$$BC = \frac{C_{\text{вс}}}{C_{\text{пос}}} \times 100 \%, \quad (2.4.4)$$

где BC – всхожесть, %;

$C_{\text{вс}}$ – количество всходов, шт.;

$C_{\text{пос}}$ – количество посаженных семян, шт.

Для определения содержания фотосинтетических пигментов навеску измельченных листьев экстрагировали 80 % этанолом при комнатной температуре с последующим центрифугированием. Концентрацию пигментов определяли спектрофотометрически измерением оптической плотности экстракта при длинах волн 663 нм (хлорофилл а), 645 нм (хлорофилл b) и 480 нм (каротиноиды).

Выделение ДНК из бактериальных клеток проводили с помощью набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit. Количество ДНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop, а также на флуориметре Qubit.

Для геномного секвенирования на платформе MGIsq бактериальную ДНК фрагментировали ультразвуком на приборе Covaris S2, обрабатывали РНКазой А и готовили ДНК-библиотеки с использованием наборов NEBNext Ultra II DNA library prepkit for Illumina и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (UDI set3). Качество ДНК-библиотек оценивали на приборе Qsep100 с использованием набора F3 Fast Cartridge. Количество библиотек определялось на флуориметре Qubit. ДНК-библиотеки

смешивались эквимольно и секвенировали на платформе MGISEQ-2000 по протоколам производителя с использованием набора DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set PE100, позволяющего проводить чтение библиотеки с обеих сторон по 100 нуклеотидов.

Для геномного секвенирования на платформе Polyseq из выделенной бактериальной ДНК готовили ДНК-библиотеки с помощью наборов Barcode Library Preparation Kit и Ligation Barcode Kit. Библиотеки смешивались в эквимольном соотношении и секвенировали на проточной ячейке PolyseqCell Sequencing Chip на платформе Polyseq One.

De novo сборка геномов и аннотирование. Прочтения, полученные на Polyseq One, фильтровались с помощью Fitlong v0.2.1 [136]. Далее проводилась сборка тремя различными ассемблерами: Flye v2.9.2 [99], Minipolish v0.1.3 [228] и Raven v1.8.1 [81]. Для полученных сборок проводили общую кластеризацию контигов, их выравнивание и нахождение консенсуса с помощью Tricycle v0.5.4 [221]. Далее в полученных геномах исправляли ошибки. На первом этапе исправления ошибок проводили программой Medaka v1.7.2 [173], использующей длинные прочтения Polyseq One. На втором этапе «полировка» генома осуществлялась при последовательном использовании Polypolish v0.5.0 [229] и POLCA v4.1.0 [231] с помощью коротких прочтений MGISEQ. Для этого последние предварительно были подготовлены следующим образом. Фильтровали риды по качеству ($QV > 20$) с одновременным удалением адаптерных последовательностей с помощью Cutadapt v5.0 [171]. Корректировали ошибки секвенирования с помощью SPAdes v4.0.0 [203] в режиме `--only-error-correction`.

Полноту сборки геномов оценивали по однокопийным генам ортологам с помощью BUSCO v5.5.0 [113]. Аннотацию геномов проводили программой Bakta v1.11.4 [103]. Таксономическую идентификацию геномов выполняли GTDB-tk v2.4.1 с использованием базы GTDB r220.0 [148].

Для исследования образцов на цитотоксичность использовалась культура клеток человека HEK293T. Согласно протоколу исследования, клетки рассаживали в 96-луночные планшеты по 12 тысяч клеток в лунку в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы. Через 24 ч добавляли исследуемый препарат

в различных количествах, через следующие 18 часов (в случае доли добавляемого образца от 10 % до 100 % от объёма культуральной среды) или через 42 часа (в случае доли образца от 0,125 % до 10 % объёма культуральной среды) надклеточную жидкость отбирали, в лунки вносили тетразолиевый краситель, смешанный с культуральной средой DMEM с финальной концентрацией 0,25 мг/мл. После 4 ч инкубации среду с реактивом отбирали, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде и регистрировали оптическую плотность раствора на длине волны 570 нм. Для оценки фонового значения использовали лунку, в которой исходно была только среда без клеток. Далее значение фона вычитали из экспериментальных значений, после чего каждое полученное значение оптической плотности делили на среднее, полученное по группе контроля, и умножали на 100 %. Для эксперимента с высокими концентрациями препаратов их финальная концентрация в культуральной среде составляла 1, 10, 25, 50, 75 и 100 %, а для эксперимента с низкими концентрациями препаратов их финальная концентрация в культуральной среде составляла 10, 5, 1, 0,5, 0,25 и 0.125 % от объёма культуральной среды. Каждый эксперимент был воспроизведён дважды в сериях по 5 технических реплик на каждое разведение препарата. Статистическую обработку результатов проводили двухфакторным дисперсионным анализом (ANOVA) и тестом Тьюки.

Все экспериментальные исследования проводились в 3–5-кратной повторности для обеспечения статистической достоверности полученных результатов. Полученные значения выражали в виде среднего арифметического значения с указанием стандартного отклонения. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Microsoft Office Excel 2021. Результаты исследования активности консорциумов ризобактерий оценивали при помощи анализа ANOVA с апостериорным критерием Шеффе.

2.5 Заключение по главе 2

Вторая глава диссертационной работы посвящена описанию объектов и методов исследования, использованных для создания биопрепарата на основе ризобактерий, устойчивых к абиотическим стрессам и обладающих комплексом биотехнологически ценных свойств. Объектами исследования выступили семена и ризосфера яровой пшеницы сорта Сибирский Альянс, выделенные штаммы ризобактерий, консорциумы на их основе, разработанный биопрепарат и тест-культуры фитопатогенных грибов.

Для достижения поставленных целей был применен комплексный подход, включающий стандартные микробиологические, биотехнологические и генетические методы. Проведены лабораторные эксперименты для выделения, идентификации и оценки биотехнологически ценных свойств ризобактерий и биопрепарата. Статистическая обработка данных проводилась в Microsoft Excel. Оценку активности консорциумов ризобактерий осуществляли при помощи анализа ANOVA с апостериорным критерием Шеффе.

Данные, представленные во второй главе, формируют основу для дальнейших экспериментальных исследований и практической апробации, освещенных в последующих разделах диссертации.

ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ

В данной главе представлены результаты всестороннего изучения выделенных из ризосферы яровой мягкой пшеницы штаммов бактерий, включающие анализ их морфологических, культуральных, физиолого-биохимических свойств, ростостимулирующей и антагонистической активности по отношению к фитопатогенам. Приводятся результаты генетической идентификации перспективных штаммов ризобактерий, отобранных для дальнейшего конструирования консорциумов.

3.1 Выделение и характеристика ризобактерий яровой мягкой пшеницы

В ходе работы из ризосферы яровой мягкой пшеницы было выделено 42 штамма бактерий, адаптированных к условиям, приближенным к реальным условиям произрастания растений. Особое внимание уделялось выделению микроорганизмов, устойчивых к действию агрохимикатов, высокой степени засоления и способных к росту на обедненных питательными компонентами средах. Каждому выделенному штамму ризобактерий был присвоен индивидуальный порядковый номер – от 1 до 42, для удобства идентификации и дальнейшего анализа. Первичная оценка выделенных ризобактерий проводилась на основе анализа их роста на агаризованной питательной среде Лурия-Бертани в модификации Миллера. Визуальная оценка роста различных штаммов представлена на рисунке 3.1.1. На следующем этапе проводилось описание культуральных свойств каждого штамма, результаты которого представлены в таблице 3.1.1. После первичной оценки культуральных свойств была проведена микроскопия выделенных штаммов для определения их морфологических признаков (рисунок 3.1.2, таблица 3.1.2).

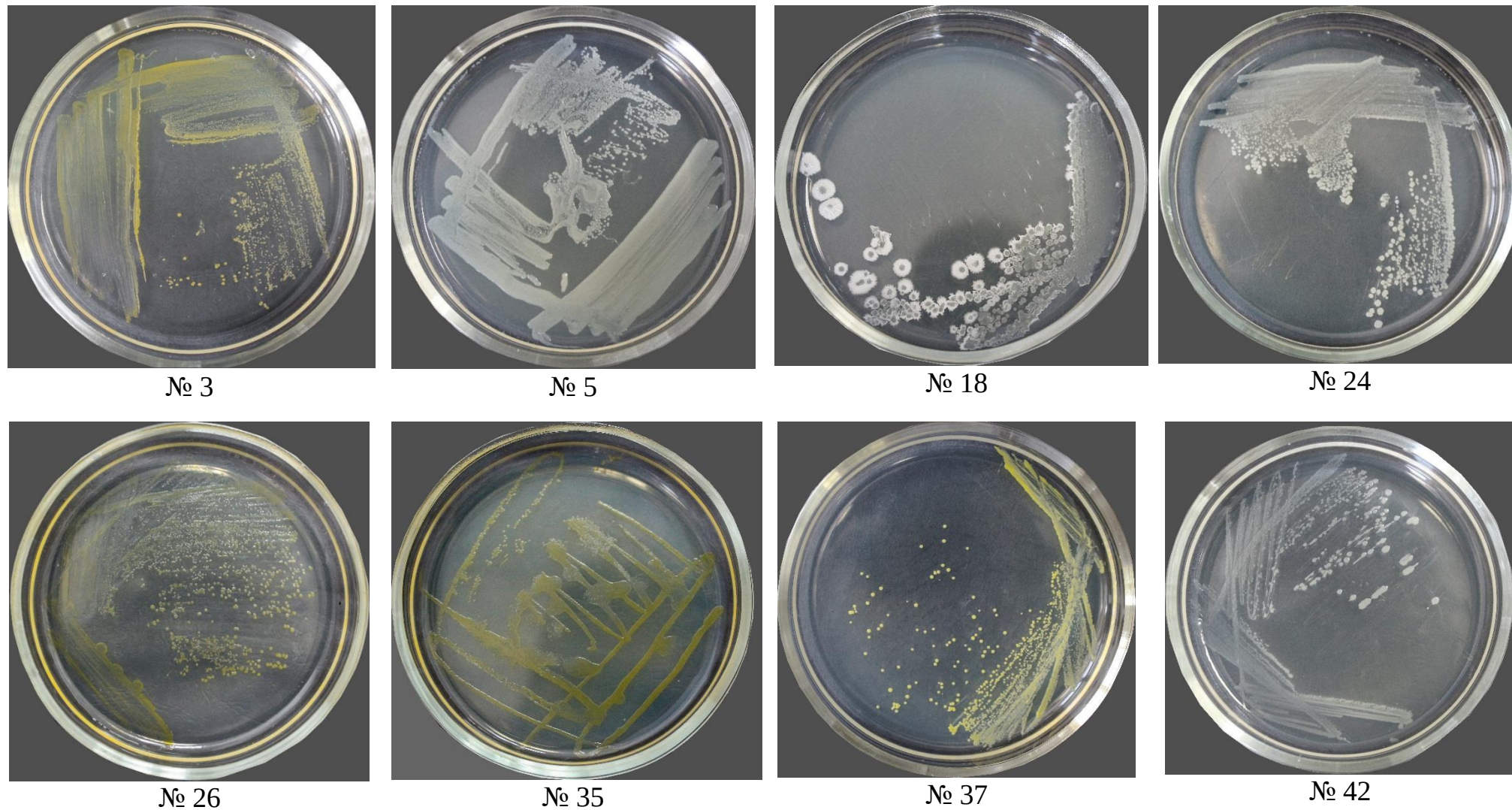


Рисунок 3.1.1 – Рост выделенных штаммов ризобактерий (№ 3, № 5, № 18, № 24, № 26, № 35, № 37 и № 42) в чашках Петри на твердой питательной среде Лурия-Бертани в модификации Миллера

Таблица 3.1.1 – Культуральные признаки выделенных ризобактерий

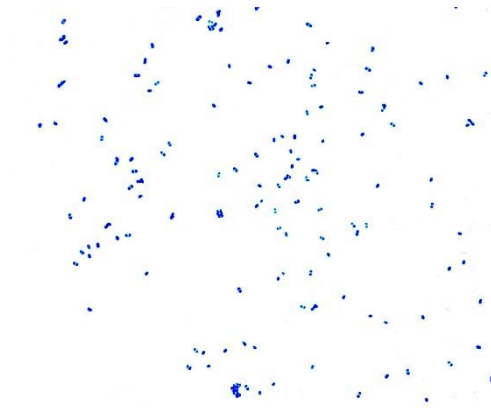
Номер штамма	Цвет колоний	Размер колонии, мм	Форма колонии	Профиль колонии	Край колонии	Фактура колонии
1	белый	2,0	круглая	плоский	ровный	глянцевая
2	белый	1,5	круглая	выпуклый	ровный	глянцевая
3	желтый	1,0	круглая	плоский	ровный	масляная
4	белесый	4,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
5	белый	6,0	круглая	приподнятый	ровный	матовая
6	белесый	3,0	круглая	приподнятый	ровный	матовая
7	белый	1,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
8	белесый	1,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
9	белый	4,0	овальная	плоский	рванный	матовая
10	белесый	2,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
11	белый	2,0	круглая	приподнятый	рванный	глянцевая
12	белый	2,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
13	белый	3,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
14	белый	1,0	круглая	приподнятый	рванный	глянцевая
15	белый	3,0	круглая	приподнятый	ровный	масляная
16	белый	2,0	круглая	плоский	ровный	масляная
17	прозрачный	1,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
18	белый	6,0	круглая	плоский	ровный	матовая
19	белый	4,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
20	белесый	1,0	круглая	выпуклый	ровный	глянцевая
21	прозрачный	1,5	овальная	выпуклый	ровный	масляная
22	прозрачный	1,0	круглая	плоский	ровный	матовая
23	прозрачный	2,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
24	белый	1,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая

Продолжение таблицы 3.1.1

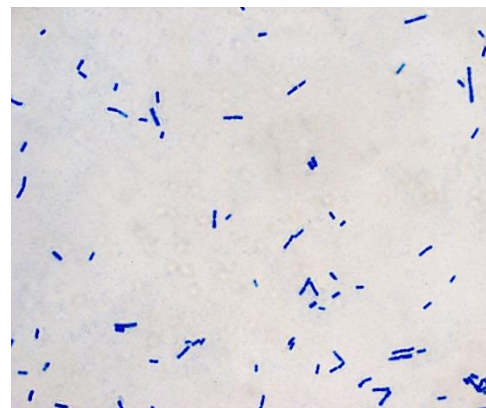
Номер штамма	Цвет колоний	Размер колонии, мм	Форма колонии	Профиль колонии	Край колонии	Фактура колонии
25	белый	1,5	круглая	плоский	ровный	матовая
26	желтый	2,0	круглая	выпуклый	ровный	масляная
27	белый	1,5	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
28	белый	3,0	круглая	плоский	ровный	матовая
29	белый	1,5	круглая	приподнятый	ровный	масляная
30	белый	3,0	круглая	выпуклый	ровный	масляная
31	белый	4,0	круглая	выпуклый	ровный	масляная
32	прозрачный	1,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
33	белый	2,5	круглая	выпуклый	ровный	масляная
34	прозрачный	2,0	овальная	плоский	ровный	глянцевая
35	желтый	1,5	круглая	приподнятый	ровный	масляная
36	желтый	1,5	круглая	плоский	ровный	масляная
37	желтый	1,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
38	белый	2,0	круглая	приподнятый	ровный	глянцевая
39	белый	2,0	круглая	выпуклый	ровный	глянцевая
40	желтый	1,5	круглая	приподнятый	ровный	масляная
41	белый	1,0	круглая	плоский	ровный	глянцевая
42	белый	2,0	круглая	приподнятый	рванный	матовая



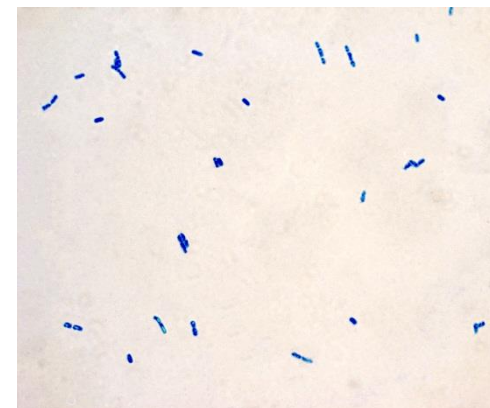
№ 3



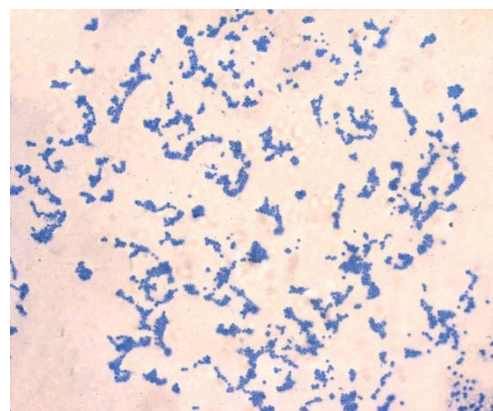
№ 5



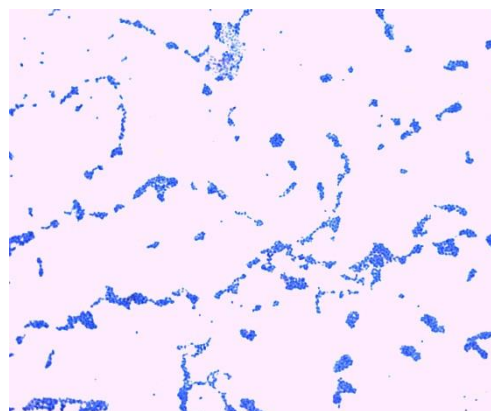
№ 12



№ 18



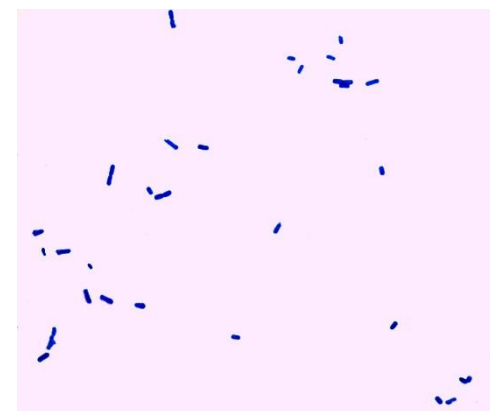
№ 19



№ 22



№ 25



№ 35

Рисунок 3.1.2 – Микроскопирование выделенных штаммов ризобактерий № 3, № 5, № 12, № 18, № 19, № 22, № 25 и № 35

Таблица 3.1.2 – Морфологические признаки выделенных ризобактерий

№ штамма	Окраска по Граму	Морфология клеток	Размер клеток, мкм
1	+	Бациллы	2,112×0,906
2	+	Бациллы	0,559×0,396
3	–	Бациллы	0,788×0,331
4	+	Бациллы	0,650×0,375
5	+	Бациллы	0,486×0,120
6	+	Бациллы	0,459×0,264
7	+	Бациллы	0,506×0,213
8	–	Бациллы	1,808×0,649
9	+	Бациллы	0,583×0,250
10	+	Бациллы	0,572×0,386
11	+	Бациллы	0,618×0,266
12	+	Бациллы	1,005×0,405
13	+	Бациллы	2,187×0,789
14	+	Бациллы	0,508×0,356
15	–	Кокки	0,543×0,543
16	+	Бациллы	0,716×0,520
17	+	Бациллы	0,979×0,584
18	+	Бациллы	0,831×0,485
19	–	Кокки	0,581×0,581
20	+	Бациллы	0,781×0,545
21	–	Кокки	0,651×0,651
22	+	Кокки	0,475×0,475
23	+	Бациллы	2,109×0,849
24	+	Бациллы	0,674×0,229
25	+	Бациллы	0,715×0,320
26	+	Бациллы	0,713×0,352
27	+	Бациллы	1,284×0,527
28	+	Бациллы	1,784×0,710
29	+	Бациллы	0,759×0,328
30	+	Кокки	0,498×0,498
31	–	Бациллы	0,682×0,312
32	+	Бациллы	0,550×0,486
33	+	Бациллы	2,006×0,865
34	+	Кокки	0,459×0,459
35	–	Бациллы	0,772×0,419
36	–	Бациллы	0,809×0,469
37	–	Бациллы	0,716×0,352
38	+	Бациллы	0,809×0,451
39	+	Бациллы	0,750×0,344
40	+	Коккобациллы	0,498×0,356
41	–	Бациллы	1,167×0,788
42	+	Бациллы	0,821×0,406

Анализ культуральных свойств, представленных в таблице 3.1.1, показал значительное разнообразие среди выделенных штаммов. Наибольшее распространение имели штаммы, образующие белые колонии. Наряду с ними были обнаружены штаммы, формирующие прозрачные, желтые и белесые колонии. В частности, 7 штаммов образовывали прозрачные колонии, 8 – желтые колонии, 7 – белесые колонии, а остальные – белые колонии. Форма колоний также варьировала: 10 % штаммов формировали овальные колонии, в то время как большинство (23 штамма) имели колонии с приподнятым профилем, 12 штаммов – с выпуклым профилем, а остальные – с плоским профилем. Характер краев колоний и фактура поверхности также различались. У 10 % штаммов наблюдались рваные края, а фактура поверхности у 8 штаммов была матовой, у 12 – масляной, а у остальных – глянцевой.

Анализ результатов окраски по Граму (таблица 3.1.2) показал, что большинство выделенных микроорганизмов являются грамположительными. Только штаммы ризобактерий № 3, № 8, № 15, № 19, № 21, № 31, № 35, № 36, № 37 и № 41 оказались грамотрицательными. Среди выделенных 42 микроорганизмов, 6 идентифицированы как кокки (штаммы № 15, № 19, № 21, № 22, № 30 и № 34), а 2 – как коккобациллы (штаммы № 32 и № 40). Остальные штаммы представляют собой бациллы различной морфологии и размеров. Размеры клеток варьируются в широком диапазоне (от 0,120 до 2,187 мкм), что может указывать на принадлежность выделенных штаммов к различным видам и родам бактерий.

В ходе работы были изучены биохимические признаки выделенных микроорганизмов с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (Приложение Б). Выявлено разнообразие метаболических профилей штаммов, устойчивость к антибиотикам и солеустойчивость. Экспрессия различных ферментов указывает, таких как нитратредуктаза и фосфатаза, указывает на потенциал этих бактерий в биостимуляции роста растений и повышении устойчивости к стрессу.

3.2 Скрининг ризобактерий с биотехнологически ценными свойствами

В рамках диссертационной работы был проведен комплекс исследований, направленный на выявление перспективных штаммов ризобактерий, обладающих ростостимулирующими и защитными свойствами в отношении модельной культуры (яровой мягкой пшеницы), подверженной биотическому стрессу. С целью отбора наиболее перспективных микроорганизмов были изучены их ключевые биотехнологически значимые признаки, такие как антиоксидантная активность, способность к синтезу фитогормонов (индолил-3-уксусной и гиббереллиновой кислот), солюбилизации фосфатов и фиксации атмосферного азота. Особое внимание уделялось оценке антагонистической активности бактерий по отношению к распространенным фитопатогенам зерновых культур, что является важным фактором для повышения устойчивости пшеницы к болезням.

Антиоксидантная активность ризобактерий, проявляющаяся в способности снижать окислительный стресс посредством ингибирования активных форм кислорода, рассматривается как важный фактор адаптации растений к неблагоприятным условиям. Как известно, дефицит питательных веществ, абиотические стрессы (засуха, засоление, температурные колебания) и, особенно, биотические стрессы (инфекции, вызванные фитопатогенными микроорганизмами) приводят к накоплению активных форм кислорода в растительных клетках, вызывая их повреждение [68, 69, 100, 181]. Способность ризобактерий снижать уровень окислительного стресса за счет синтеза антиоксидантных веществ позволяет повысить устойчивость растений к негативному воздействию окружающей среды. В связи с этим, в данном исследовании проводилась оценка антиоксидантной активности выделенных штаммов ризобактерий как одного из ключевых факторов, определяющих их перспективность для применения в сельском хозяйстве.

Синтез фитогормонов, таких как индолил-3-уксусная и гиббереллиновая кислоты, также является важным ростостимулирующим свойством ризобактерий. Установлено, что ИУК, как представитель класса ауксинов, играет ключевую роль

в регуляции процессов роста и развития растений, повышая их приживаемость [50, 125]. Экзогенное внесение ИУК стимулирует рост различных сельскохозяйственных культур, особенно в стрессовых условиях. Ранее проведенные исследования показали, что экзогенная ИУК способна проникать через листья и транспортироваться в другие органы растения, где длительное время сохраняется, способствуя росту в условиях засоления и засухи [133, 154].

Гиббереллиновая кислота, в свою очередь, является регулятором многочисленных процессов развития растений на протяжении всего жизненного цикла, от прорастания семян до развития плодов. Кроме того, она смягчает негативное воздействие биотических и абиотических стрессов на растения [209]. В условиях засухи происходит снижение накопления эндогенной ГК в клетках, что приводит к подавлению прорастания семян, роста побегов и развития плодов [213]. Внесение экзогенной ГК может компенсировать этот дефицит, повышая ростовые показатели и развитие сельскохозяйственных культур. Известно также, что гиббереллиновая кислота частично нивелирует негативное воздействие засоления, повышая активность антиоксидантных ферментов, накопление осмолитов и содержание аминокислот в зародыше [155, 167, 195, 197].

Исследование способности ризобактерий к фиксации атмосферного азота и солюбилизации фосфатов обусловлено важной ролью этих процессов в обеспечении растений необходимыми питательными элементами. Азот и фосфор являются важнейшими биогенными элементами, необходимыми для нормального роста и развития растений. Азот в почве преимущественно находится в органической форме, труднодоступной для большинства растений [205]. Фосфор также содержится в почвах в больших количествах, но значительная его часть находится в недоступной для растений форме [107]. Трансформация атмосферного азота и фосфора бактериями в доступные формы способствует улучшению питания растений и снижает потребность в дополнительном внесении химических азотных и фосфорсодержащих удобрений [107].

Результаты исследований по оценке ростостимулирующих свойств ризобактерий, выделенных из ризосферы яровой мягкой пшеницы, представлены на рисунках 3.2.1–3.2.5.

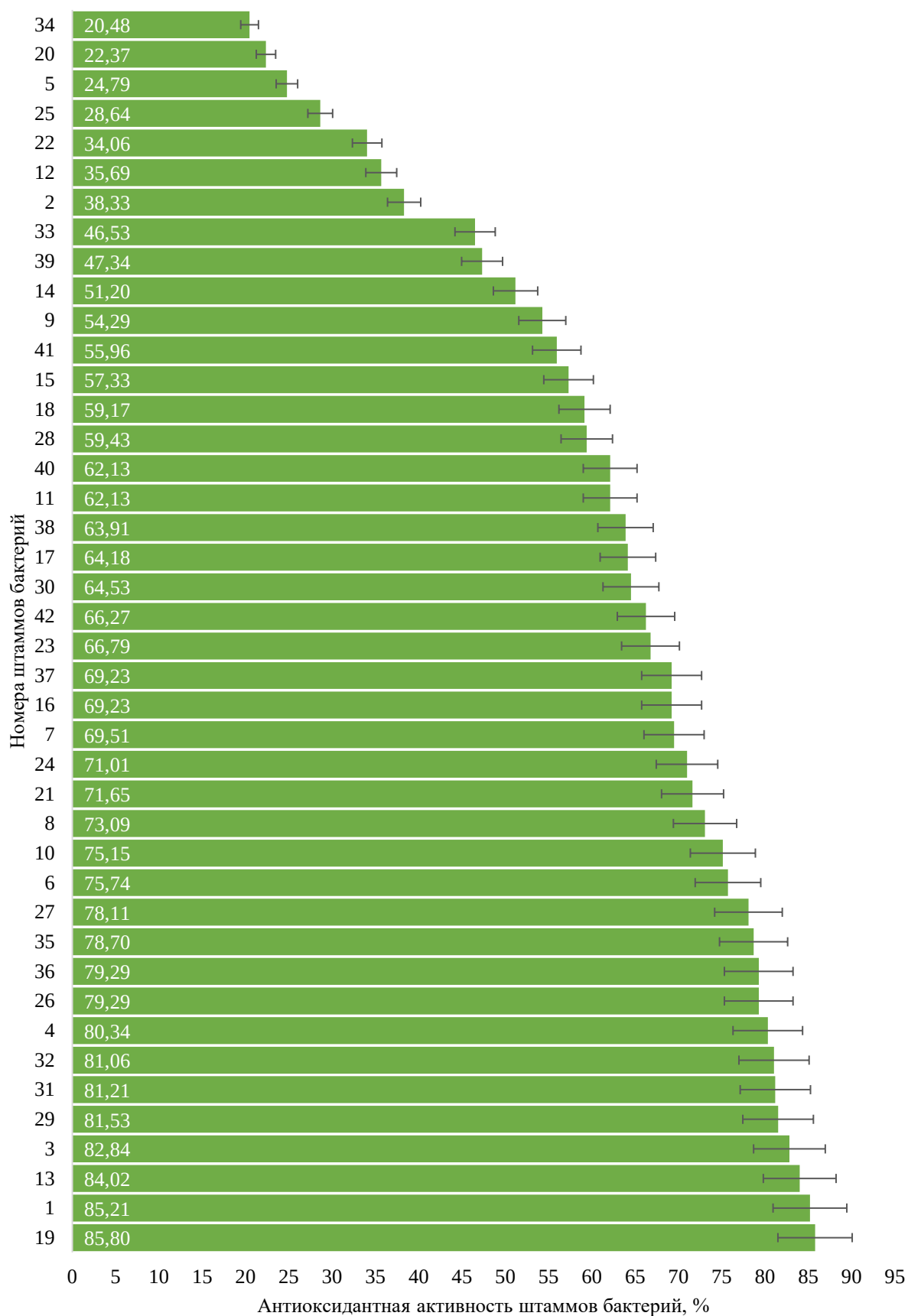


Рисунок 3.2.1 – Результаты определения антиоксидантной активности
выделенных штаммов с планкой погрешности процент

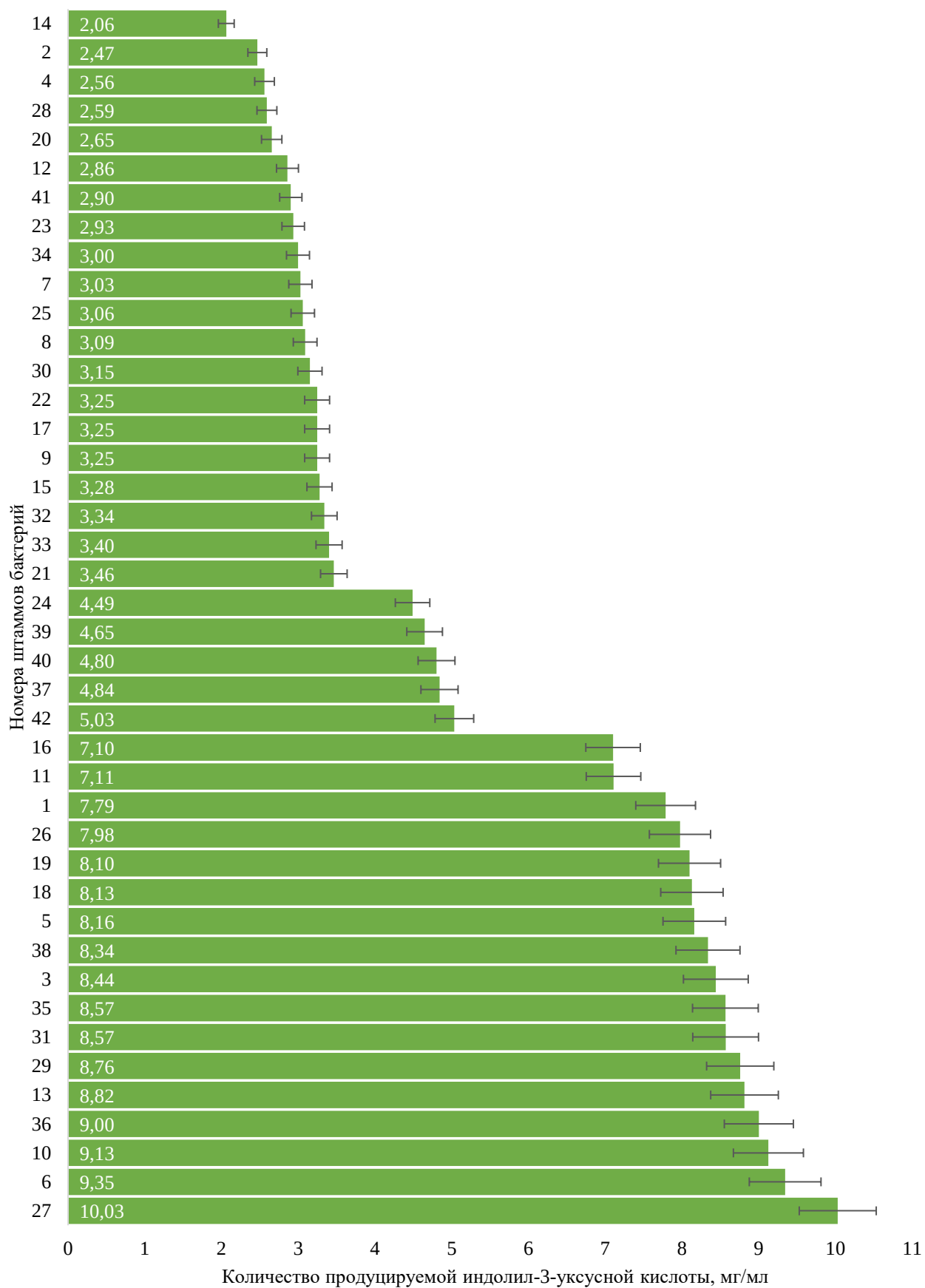


Рисунок 3.2.2 – Количество продуцируемой индолил-3-уксусной кислоты
выделенными штаммами с планкой погрешности процент

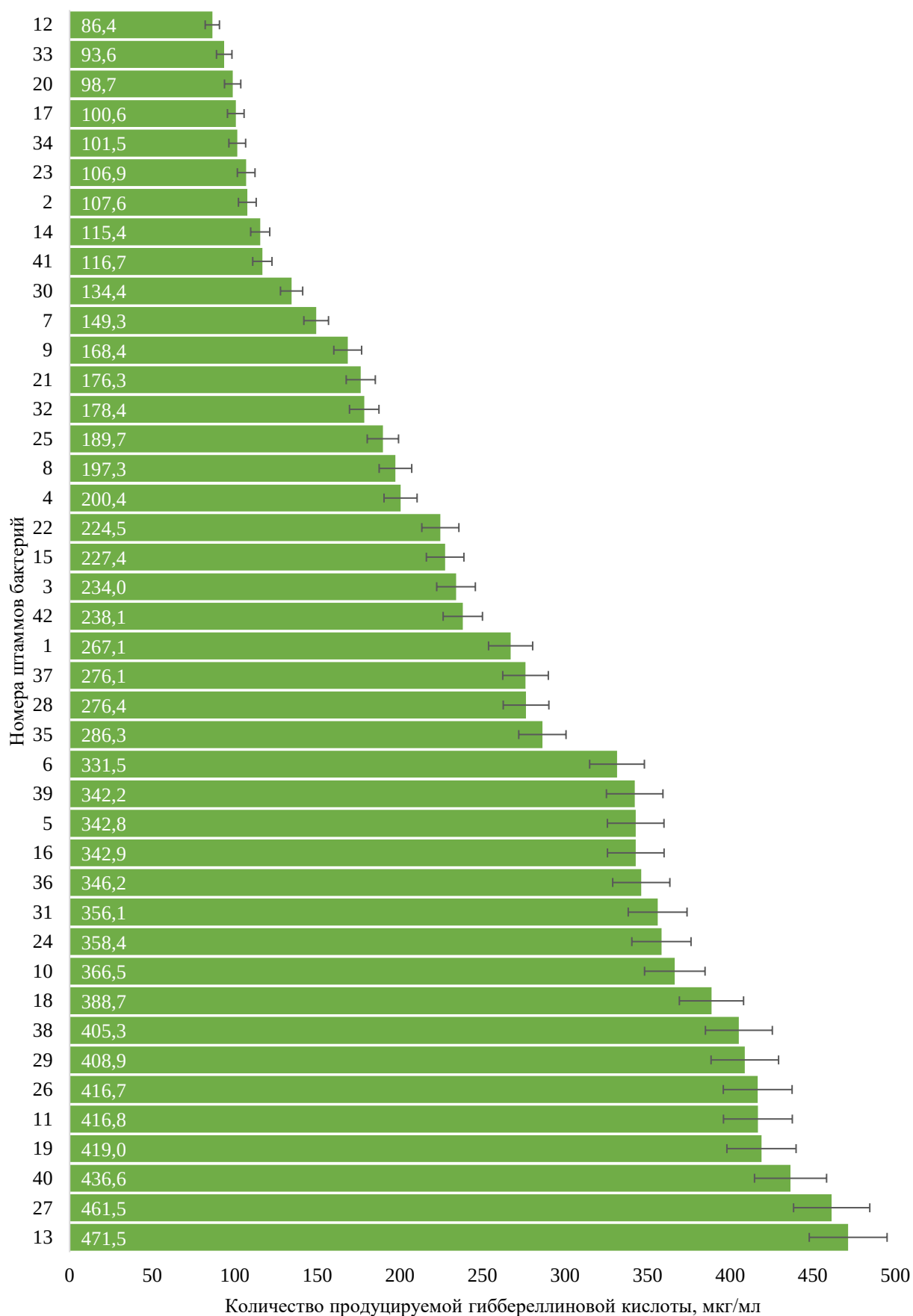


Рисунок 3.2.3 – Количество продуцируемой гиббереллиновой кислоты
выделенными штаммами с планкой погрешности процент

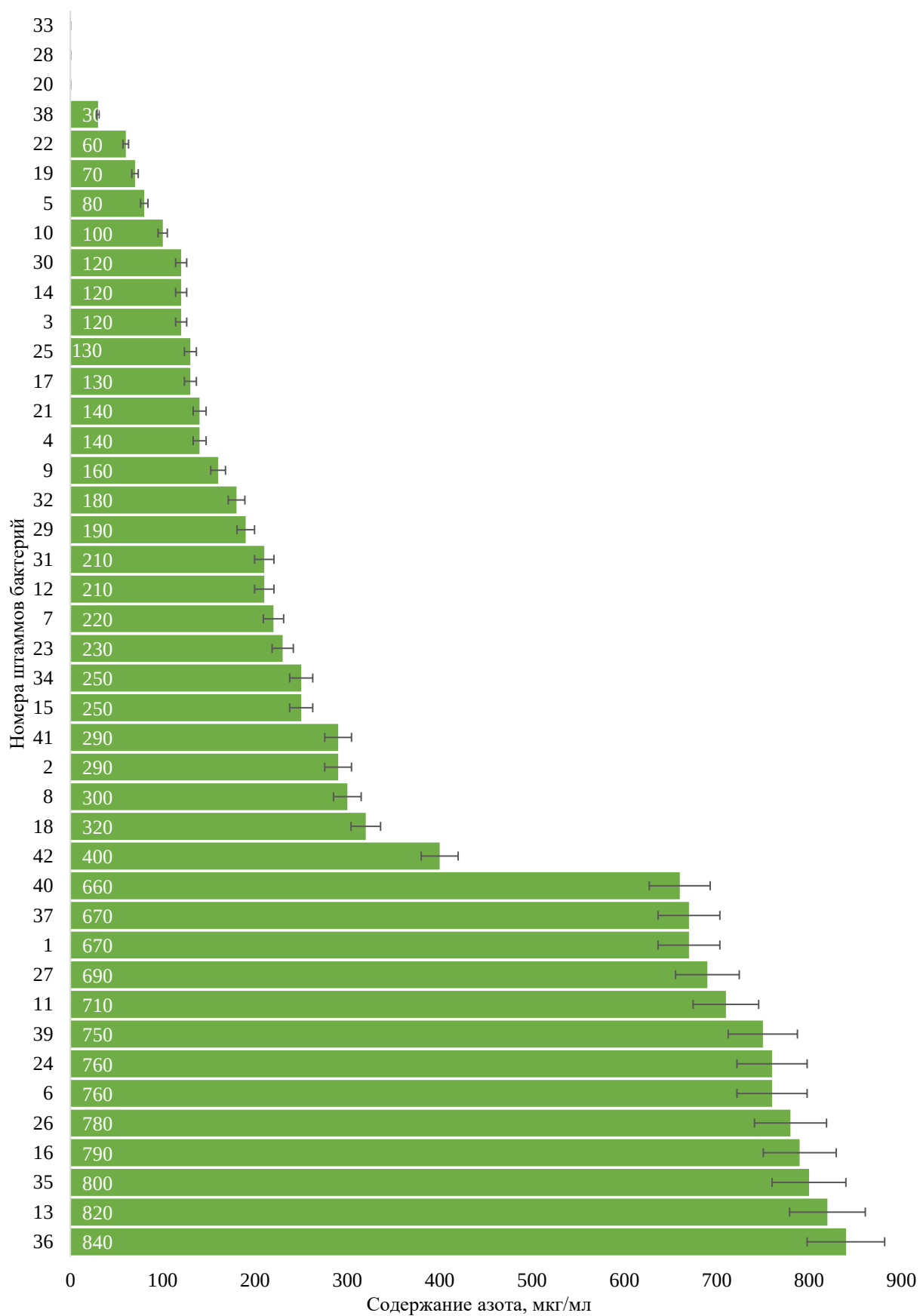


Рисунок 3.2.4 – Способность к фиксированию азота выделенными штаммами с планкой погрешности процент

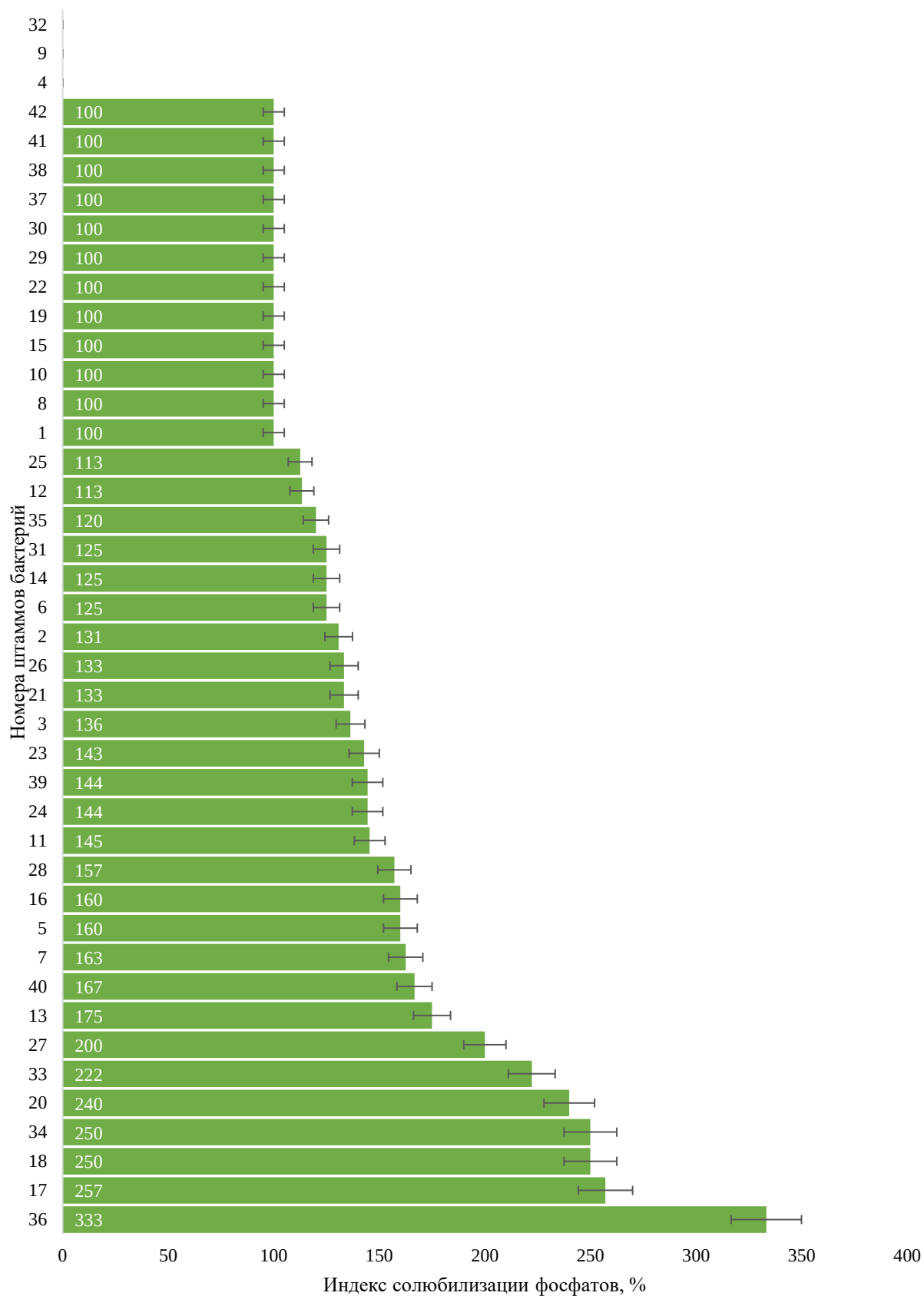


Рисунок 3.2.5 – Способность к солюбилизации фосфатов выделенными штаммами с планкой погрешности процент

Антиоксидантная активность является важным показателем способности микроорганизмов защищать растения от окислительного стресса, возникающего в условиях неблагоприятных воздействий, в том числе при патогенезе. Определение АОА проводилось с использованием спектрофотометрического метода, основанного на реакции с реактивом DPPH [187]. Полученные результаты представлены на рисунке 3.2.1. Анализ данных показал значительную вариабельность АОА среди исследуемых штаммов. Диапазон значений составил от 20,4 % (штамм № 34) до 85,8 % (штамм № 19). Среднее значение антиоксидантной активности по всем ризобактериям составило 63,8 %. Штамм № 19 показал максимальную антиоксидантную активность, превышающую среднее значение на 34,5 %. В группу лидеров по АОА (штаммы, демонстрирующие значения выше 75 %) вошли штаммы ризобактерий № 1, № 3, № 4, № 6, № 10, № 13, № 19, № 26, № 27, № 29, № 31–33, № 35, № 36 – всего 14 штаммов. Данные ризобактерии могут быть перспективны для включения в состав биопрепаратов, предназначенных для повышения устойчивости пшеницы к различным стрессовым факторам.

Синтез индолил-3-уксусной кислоты ризобактериями играет важную роль в стимуляции роста растений, влияя на процессы деления и растяжения клеток, формирование корневой системы. Количественное определение ИУК проводилось методом колориметрического анализа с реактивом Сальковского [186]. Результаты измерений представлены на рисунке 3.2.2. Установлено, что исследуемые штаммы ризобактерий обладали различной способностью к синтезу индолил-3-уксусной кислоты. Значения варьировались в диапазоне от 2,06 мг/мл (штамм № 14) до 10,03 мг/мл (штамм № 27). Среднее значение синтеза ИУК составило 5,33 мг/мл. Штамм № 27 продемонстрировал максимальную продукцию фитогормона, превышающую среднее значение на 88,2 %. В группу штаммов с высоким уровнем синтеза индолил-3-уксусной кислоты (более 8 мг/мл) вошли штаммы ризобактерий № 3, № 5, № 6, № 10, № 13, № 18, № 19, № 24, № 31, № 35, № 36, № 38. Эти штаммы представляют интерес для разработки биостимуляторов роста растений.

Гиббереллины, синтезируемые ризобактериями, также играют важную роль в регуляции ростовых процессов у растений, стимулируя прорастание семян,

удлинение стебля и другие физиологические процессы. Определение концентрации гиббереллиновой кислоты проводилось спектрофотометрическим методом [126]. Данные представлены на рисунке 3.2.3. Результаты показали, что исследуемые ризобактерии значительно различаются по способности к синтезу ГК. Диапазон значений составил от 86 мкг/мл (штамм № 12) до 472 мкг/мл (штамм № 13). Средняя продукция фитогормона среди исследуемых штаммов ризобактерий составила 268,5 мкг/мл. Максимальное значение было зафиксировано у штамма № 13 (472 мкг/мл), что на 75,8 % превышает среднее значение. К перспективным штаммам по синтезу гиббереллиновой кислоты также относятся № 19 (419 мкг/мл), № 26 (417 мкг/мл), № 11 (417 мкг/мл), № 40 (437 мкг/мл), № 29 (409 мкг/мл), № 38 (405 мкг/мл), № 18 (389 мкг/мл), № 5 (367 мкг/мл), № 10 (367 мкг/мл), № 24 (358 мкг/мл), № 36 (346 мкг/мл) и № 16 (343 мкг/мл). Таким образом, 31 % исследуемых штаммов демонстрируют повышенную способность к синтезу гиббереллинов и могут быть использованы для стимуляции роста и развития пшеницы.

Азотфиксация является важным свойством ризобактерий, позволяющим им обеспечивать растения доступным азотом, снижая потребность в минеральных удобрениях. Азотфиксирующую активность определяли по модифицированной методике А. Cordova-Rodriguez et al. [201]. Результаты исследований отражены на рисунке 3.2.4. Установлено, что не все исследуемые штаммы ризобактерий обладают способностью к фиксации азота – штаммы ризобактерий № 20, № 28 и № 33 не проявили азотфиксирующей способности. Диапазон значений составил от 0 мкг/л (штаммы № 20, № 28, № 33) до 850 мкг/л. Средняя азотфиксирующая активность по всем штаммам составила 344,8 мкг/л. Наибольшая активность выявлена у штамма № 5 (850 мкг/л), что на 146,5 % выше среднего значения. 33,3 % (14 штаммов ризобактерий) продемонстрировали активность выше 650 мкг/л, что позволяет рассматривать их как перспективные азотфиксаторы для использования в агротехнологиях.

Солюбилизация фосфатов ризобактериями является важным механизмом повышения доступности фосфора для растений, улучшая их фосфорное питание.

Способность к солюбилизации фосфатов определяли измерения диаметра колонии и зоны просветления [188]. Оценка эффективности солюбилизации представлена на рисунке 3.2.5. Анализ полученных данных показал значительную вариабельность в способности ризобактерий к солюбилизации фосфатов. Среднее значение по всем штаммам составило 131,5 %. Наибольшая активность была зафиксирована у штамма № 36 (334 %), что на 154 % выше среднего значения. Штаммы ризобактерий № 17 (257 %), № 18 (250 %), № 34 (250 %) и № 20 (240 %) также продемонстрировали высокую способность к растворению фосфатов. Кроме того, к перспективным штаммам можно отнести № 33 (223 %) и № 27 (200 %). Таким образом, 7 штаммов из 42 (16,7 %) обладают выраженной способностью к солюбилизации фосфатов и могут быть использованы для повышения доступности фосфора для растений. Необходимо отметить, что штаммы № 4, № 9, № 32 не показали способности к растворению нерастворимых фосфатов.

После всестороннего изучения ростостимулирующих свойств выделенных штаммов ризобактерий, включающих антиоксидантную активность, продукцию индолил-3-уксусной и гиббереллиновой кислот, способность к азотфиксации и растворению фосфатов, необходимо ранжирование полученных результатов для отбора наиболее перспективных штаммов для дальнейшего конструирования консорциумов. Ранжирование проводилось с целью выявления штаммов, обладающих наиболее выраженным комплексом ростостимулирующих факторов.

Для ранжирования была разработана балльная система оценки, учитывающая результаты количественного определения каждого из изучаемых ростостимулирующих показателей (таблицы 2.4.1 и 2.4.2). Присвоение баллов осуществлялось на основании сравнения полученных значений для каждого штамма относительно средних значений по всей выборке. На основании полученных баллов для каждого показателя, был рассчитан средний ранг для каждого штамма. Этот средний ранг послужил итоговым критерием для отбора перспективных штаммов ризобактерий (таблица 3.2.1, рисунок 3.2.6).

Таблица 3.2.1 – Ранжирование свойств выделенных штаммов ризобактерий

№	Балл					Ранг				
	АОА	ИУК	ГК	Азот	Фосфаты	АОА	ИУК	ГК	Азот	Фосфаты
1	5	3	3	4	0	0,25	1,2	1,05	0,4	0,0
2	3	2	2	3	2	0,15	0,8	0,70	0,3	0,2
3	5	4	3	2	2	0,25	1,6	1,05	0,2	0,2
4	4	2	3	2	0	0,20	0,8	1,05	0,2	0,0
5	2	4	3	1	2	0,10	1,6	1,05	0,1	0,2
6	4	4	3	5	2	0,20	1,6	1,05	0,5	0,2
7	4	2	2	3	3	0,20	0,8	0,70	0,3	0,3
8	4	2	3	3	0	0,20	0,8	1,05	0,3	0,0
9	3	2	3	2	0	0,15	0,8	1,05	0,2	0,0
10	4	4	4	2	0	0,20	1,6	1,40	0,2	0,0
11	4	3	4	4	2	0,20	1,2	1,40	0,4	0,2
12	3	2	2	3	1	0,15	0,8	0,70	0,3	0,1
13	5	4	5	5	3	0,25	1,6	1,75	0,5	0,3
14	3	1	2	2	2	0,15	0,4	0,70	0,2	0,2
15	3	2	3	3	0	0,15	0,8	1,05	0,3	0,0
16	4	3	3	5	2	0,20	1,2	1,05	0,5	0,2
17	4	2	2	2	4	0,20	0,8	0,70	0,2	0,4
18	3	4	4	3	3	0,15	1,6	1,40	0,3	0,3
19	5	4	4	1	0	0,25	1,6	1,40	0,1	0,0
20	2	2	2	0	3	0,10	0,8	0,70	0,0	0,3
21	4	2	3	2	2	0,20	0,8	1,05	0,2	0,2
22	3	2	3	1	0	0,15	0,8	1,05	0,1	0,0
23	4	2	2	3	2	0,20	0,8	0,70	0,3	0,2
24	4	3	4	5	2	0,20	1,2	1,40	0,5	0,2
25	2	2	3	2	2	0,10	0,8	1,05	0,2	0,2
26	4	3	4	5	2	0,20	1,2	1,40	0,5	0,2
27	4	4	5	4	3	0,20	1,6	1,75	0,4	0,3
28	3	2	3	0	2	0,15	0,8	1,05	0,0	0,2
29	5	4	4	2	0	0,25	1,6	1,40	0,2	0,0
30	4	2	2	2	0	0,20	0,8	0,70	0,2	0,0
31	5	4	4	3	2	0,25	1,6	1,40	0,3	0,2
32	5	2	3	2	0	0,25	0,8	1,05	0,2	0,0
33	3	2	2	0	3	0,15	0,8	0,70	0,0	0,3
34	2	2	2	3	3	0,10	0,8	0,70	0,3	0,3
35	4	4	3	5	1	0,20	1,6	1,05	0,5	0,1
36	4	4	3	5	5	0,20	1,6	1,05	0,5	0,5
37	4	3	3	4	0	0,20	1,2	1,05	0,4	0,0
38	4	4	4	1	0	0,20	1,6	1,40	0,1	0,0
39	3	3	3	4	2	0,15	1,2	1,05	0,4	0,2
40	4	3	4	4	3	0,20	1,2	1,40	0,4	0,3
41	3	2	2	3	0	0,15	0,8	0,70	0,3	0,0
42	4	3	3	3	0	0,20	1,2	1,05	0,3	0,0

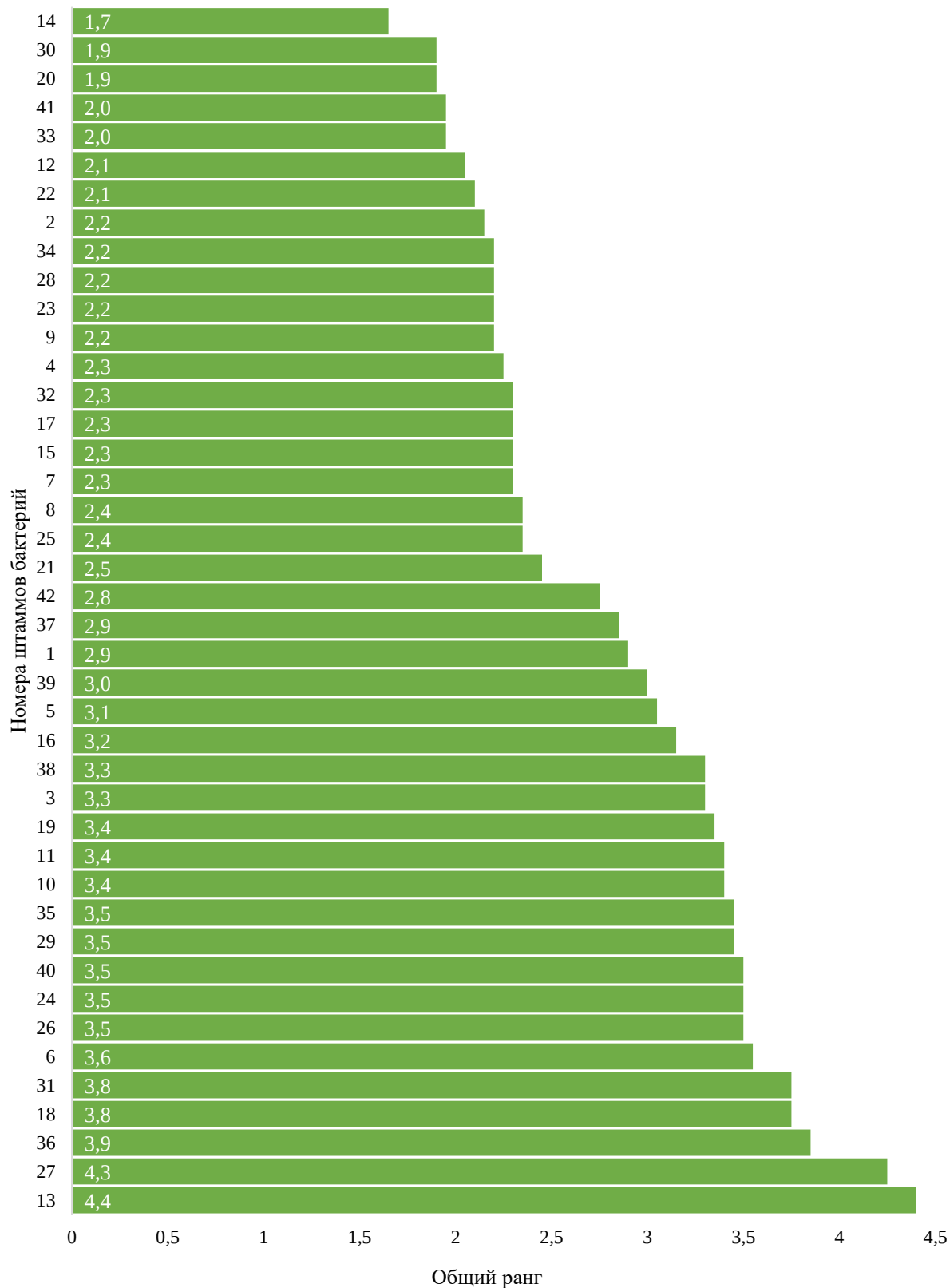


Рисунок 3.2.6 – Общий ранг выделенных ризобактерий по биотехнологически ценным свойствам

В результате проведенного ранжирования ростостимулирующих свойств были отобраны 11 штаммов ризобактерий, показавших наиболее высокие средние ранги (от 3,5 и выше): № 13 (4,4), № 27 (4,3), № 36 (3,9), № 18 (3,8), № 31 (3,8), № 6 (3,6), № 26 (3,5), № 24 (3,5), № 40 (3,5), № 29 (3,5) и № 35 (3,5). Данные ризобактерии признаны перспективными для дальнейшей оценки антагонистической активности в отношении фитопатогенов зерновых культур.

Следующим этапом исследований стало изучение антагонистической активности отобранных штаммов в отношении ряда фитопатогенных грибов зерновых культур. В качестве тест-объектов были выбраны следующие фитопатогены: *Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006.

Фузариоз колоса, вызываемый преимущественно *Fusarium graminearum*, является заболеванием, приводящим к значительным потерям урожая и ухудшению качества зерна зерновых культур [81, 137, 139]. Заражение семян *Bipolaris sorokiniana* может привести к заболеванию «черная точка», что, в свою очередь, снижает качество и всхожесть семян и увеличивает риск заражения растения корневой гнилью и пятнистостью семян [93]. *Botrytis cinerea* – широко распространенный фитопатоген, поражающий многочисленные растения, в том числе многие важные виды сельскохозяйственных культур. Он вызывает заболевание серой гнили, поражая стебли, листья и плоды, что, как и у первых двух фитопатогенных грибов, приводит к значительным потерям урожая, и, следовательно, к экономическим затратам [90, 208].

Оценка антагонистической активности проводилась методом агаровых блоков, основанным на измерении диаметра зоны ингибирования роста фитопатогена вокруг колонии ризобактерии. Полученные результаты представлены в виде зон подавления роста фитопатогенных грибов (рисунки 3.2.7–3.2.9).

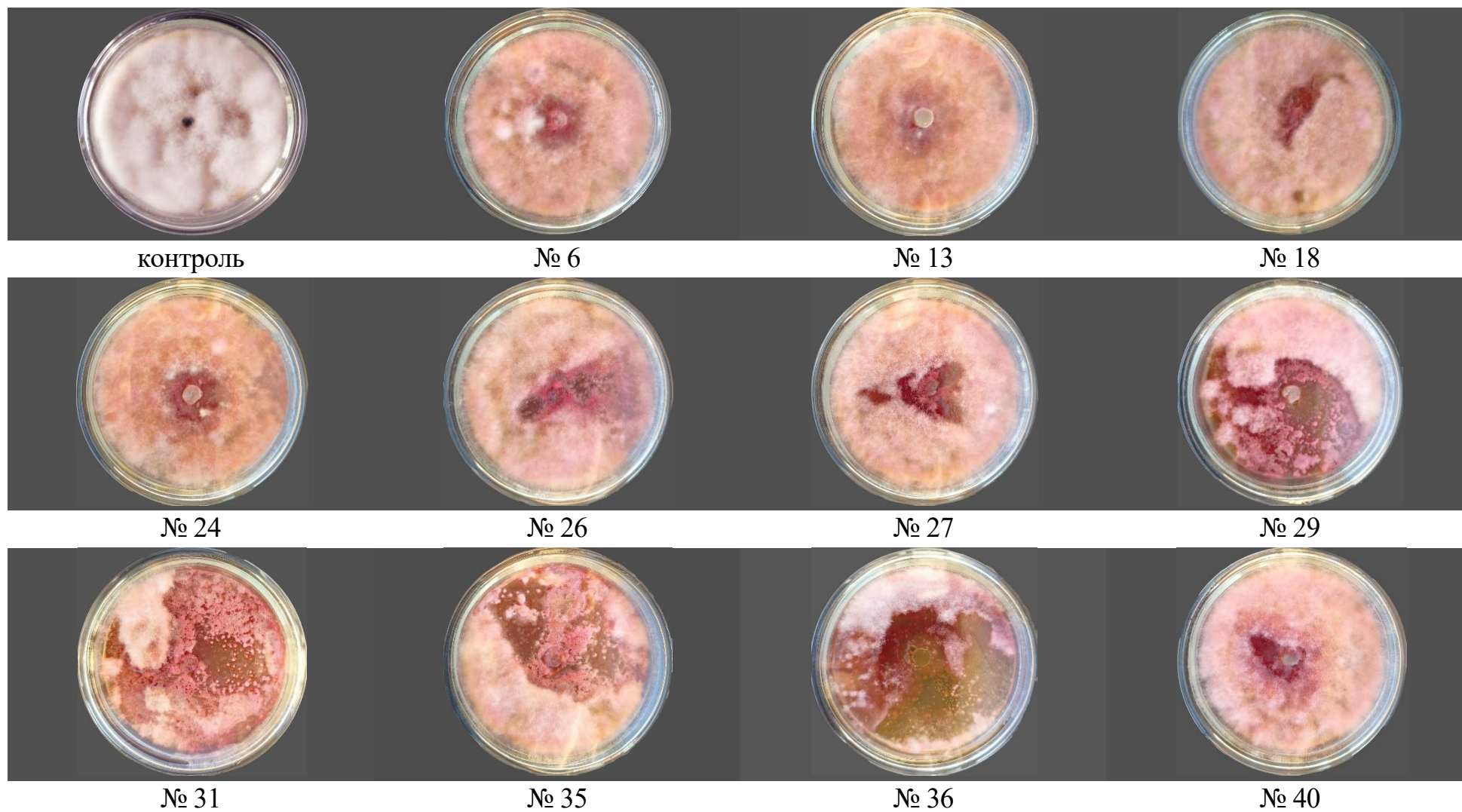


Рисунок 3.2.7 – Антагонистическая активность выделенных штаммов в отношении *Fusarium graminearum* F-877

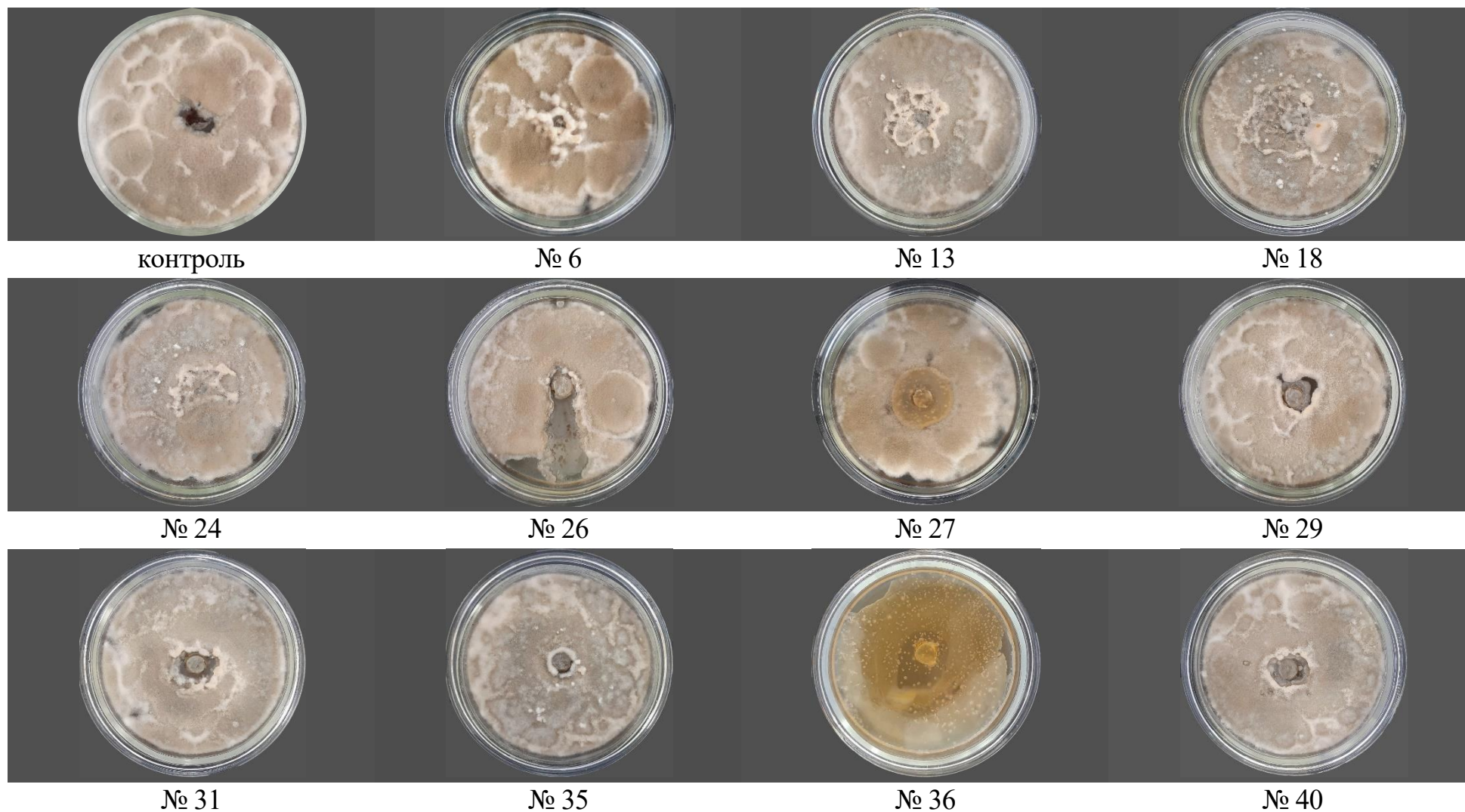


Рисунок 3.2.8 – Антагонистическая активность выделенных штаммов в отношении *Bipolaris sorokiniana* F-529

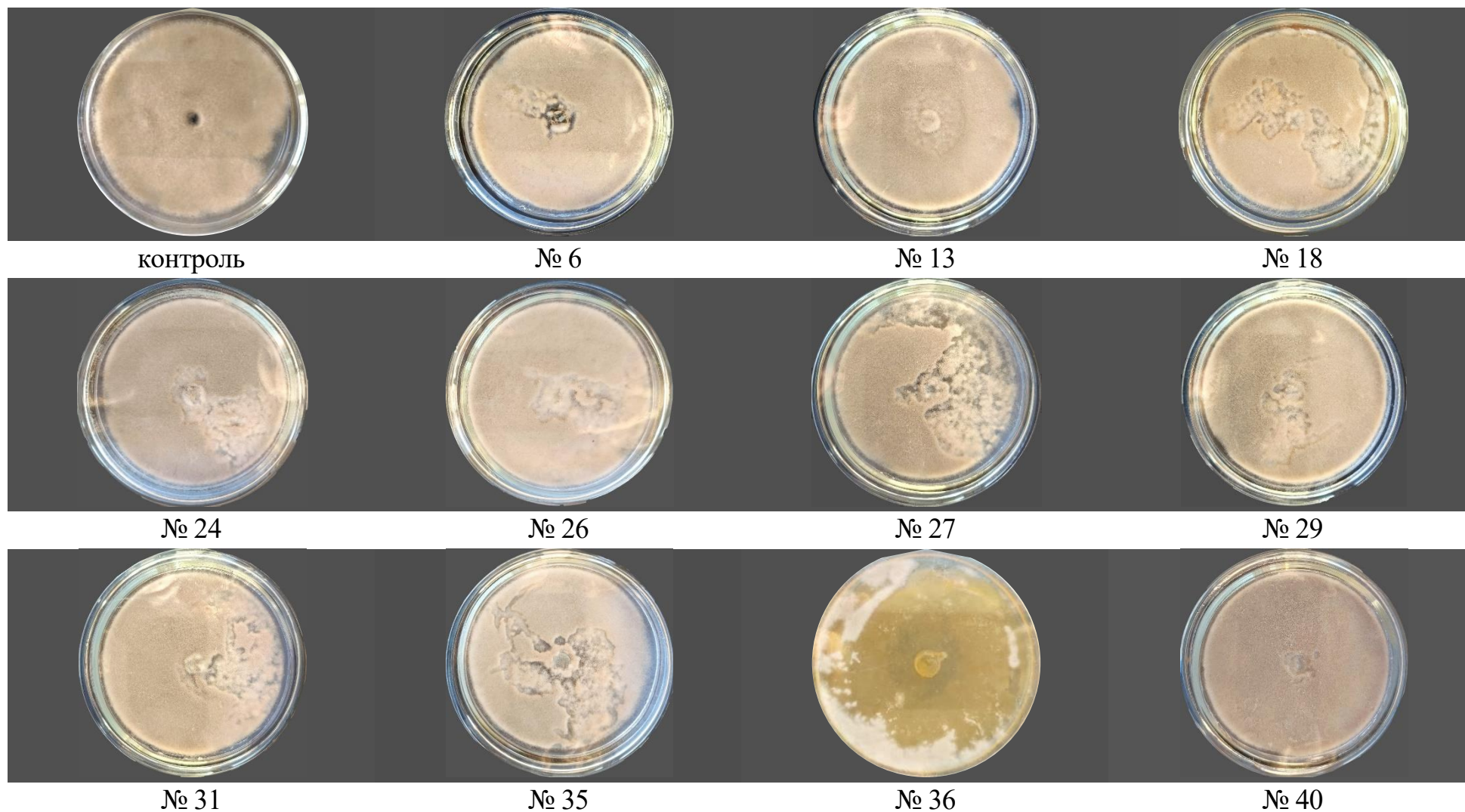


Рисунок 3.2.9 – Антагонистическая активность выделенных штаммов в отношении *Botrytis cinerea* F-1006

Для количественной оценки антагонистической активности определялся средний диаметр зоны ингибирования (см) для каждого штамма в отношении каждого фитопатогена. Полученные данные были переведены в балльную систему и проранжированы (таблицы 2.4.3 и 2.4.4). Сводные данные по антагонистической активности представлены в таблице 3.2.2 и на рисунке 3.2.10.

Таблица 3.2.2 – Результаты исследования антагонистической активности ризобактерий в отношении фитопатогенных грибов

№ штамма	Средний диаметр зоны ингибирования, см								
	<i>Fusarium graminearum</i>			<i>Bipolaris sorokiniana</i>			<i>Botrytis cinerea</i>		
	см	балл	ранг	см	балл	ранг	см	балл	ранг
6	2,7±0,1	2	1,0	1,0±0,1	0	0,0	2,5±0,1	2	0,4
13	1,0±0,1	0	0,0	1,0±0,1	0	0,0	1,0±0,1	0	0,0
18	2,5±0,1	2	1,0	1,0±0,1	0	0,0	3,0±0,1	2	0,4
24	2,2±0,1	2	1,0	1,0±0,1	0	0,0	4,0±0,2	2	0,4
26	3,5±0,1	2	1,0	4,3±0,2	3	0,9	3,6±0,1	2	0,4
27	2,5±0,1	2	1,0	3,0±0,1	2	0,6	4,0±0,1	2	0,4
29	6,8±0,2	4	2,0	2,0±0,1	1	0,3	5,8±0,2	4	0,8
31	7,8±0,2	4	2,0	1,9±0,1	1	0,3	6,3±0,1	3	0,6
35	6,6±0,2	4	2,0	1,5±0,1	1	0,3	4,0±0,1	2	0,4
36	8,6±0,3	5	2,5	9,5±0,3	5	1,5	7,0±0,2	4	0,8
40	2,5±0,1	2	1,0	1,8±0,1	1	0,3	2,0±0,1	1	0,2

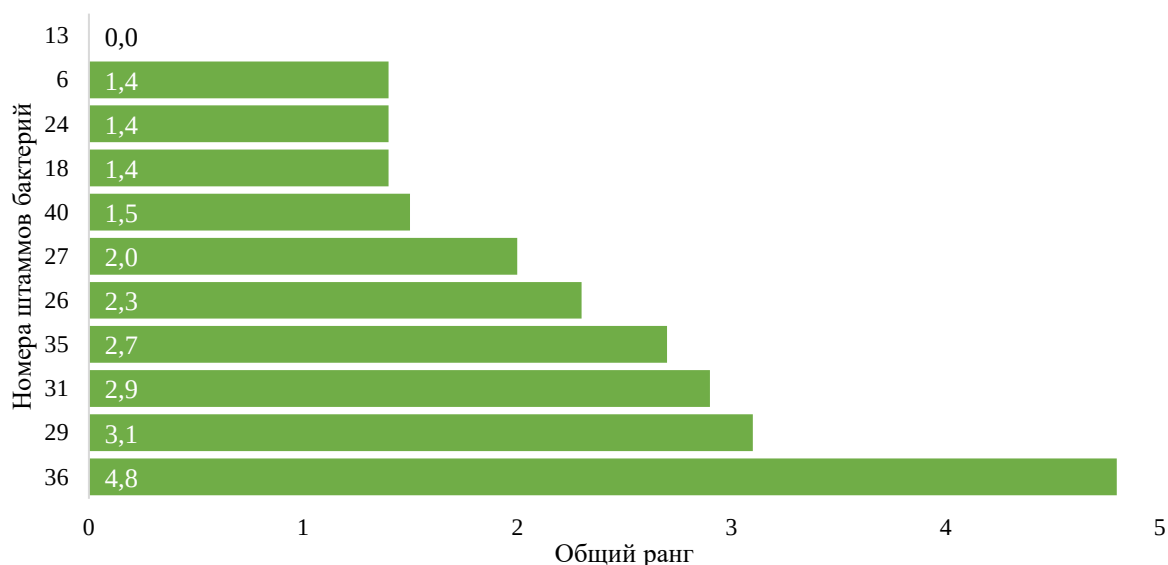


Рисунок 3.2.10 – Общий ранг выделенных ризобактерий по показателям антагонистической активности

Анализ полученных данных (таблица 3.2.2) показал, что максимальной антагонистической активностью в отношении *Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529 и *Botrytis cinerea* F-1006 характеризовался штамм № 36 (средний диаметр зоны ингибирования составил 8,6; 9,5 и 7,0 см соответственно). Штамм № 13 не проявлял антагонистической активности к исследуемым фитопатогенным грибам, штаммы № 6 и 18 – к *Bipolaris sorokiniana* F-529.

Для комплексной оценки ростостимулирующего и антагонистического потенциала штаммов ризобактерий был рассчитан общий ранг, учитывающий результаты, полученные на предыдущих этапах исследований (рисунок 3.2.10).

На основании полученных данных, для дальнейшего конструирования бактериальных консорциумов и потенциального создания биопрепарата были отобраны штаммы бактерий, показавшие наиболее высокие общие ранги (более 2,0): № 36 (4,8), № 29 (3,1); № 31 (2,9), № 35 (2,7), № 26 (2,3). Выбор данных штаммов обусловлен их способностью не только стимулировать рост и развитие растений, но и эффективно подавлять развитие основных фитопатогенов зерновых культур.

3.3 Генетическая идентификация перспективных ризобактерий

Для идентификации вида и рода отобранных перспективных штаммов ризобактерий (№ 26, № 29, № 31, № 35, № 36) был проведен анализ последовательности переменных участков 16S рРНК в Биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Результаты представлены в таблице 3.3.1.

Таблица 3.3.1 Результаты генетической идентификации штаммов ризобактерий

№	Название/ № ВКПМ	Нуклеотидная последовательность
1	2	3
26	<i>Bacillus thuringiensis</i> B-14700	CTCAGTCTSCCAGTKKCCAATGACCCWCCACGGTTGAGCCG TGGGCTTTACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCT TTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATT ACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTA GGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCT TCCCTAACAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACT CACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAG ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTC AGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCA TCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGC GACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTC AATTTCGAACCATGCGGTTCAAAATGTTATCCGGTATTAGCC CCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTATGGGCAGGTTACCC ACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCAA GCTCTTAATCCATTGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCC GCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACCTCT
29	<i>Bacillus subtilis</i> B-14701	CTYCTCTTCTGCACTCAAGTTCCTCCAGTTTCCAATGACCC TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTACATCAGACTTAAGA AACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACA ACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT AGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACC GCCCTATTYGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAG CTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGC TCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGC TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTG TGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCT TGGTGAGCCRTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCG GGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTT TGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCC GGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCC ACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGGAGCA AGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTARGCAG CCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATC
31	<i>Raoultella ornithinolytica</i> B-14725	ACTCARGCCTGCCAGTTTCAATGCAGTTCCCAGGTTGAGC CCGGGGATTTCACATCTGACTTAACAGACCGCCTGCGTG CGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAAACGCTTGACCCCTC CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCT TCTTCTGCGAGTAACGTCAATCGCYAAGGTTATTAACCTT AACGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAA GGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGC GCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA GTCT

Продолжение таблицы 3.3.1

1	2	3
31	<i>Raoultella ornithinolytica</i> B-14725	GGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCA GACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCATTACCCC ACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAT GAGGCCCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCTTGCGACGTTAT GCGGTATTAGCTACYGTTTCCAGTARTTATCCCCCTCCAT CAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACCCGWCCGCCGCTC GTCACCCRAGAGMAAGCTCTC
35	<i>Pantoea agglomerans</i> B-14726	CCAGGKTWRGCCCCGGGGATTTCRCATCTGACTTAACAGA CCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAAAC GCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGGAG TTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCACTGC GGTTATTAACCACAATGCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTAC TTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGC TGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGC TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGT GTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGC CTAGGTGGGCCGTTACCCCGCCTACTAGCTAATCCCATC TGGGTTTCATCCGATAGTGAGAGGCCCTAAGGTCCCCCTC TTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCCACCGTTTCC AGTGGTTATCCCCCTCTATCGGGCAGATCCCCAGACATT ACTCACCCGTCCGCCACTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCT CTGTGCTACCGTCCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCC AGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAACCTCT
36	<i>Pantoea vagans</i> B-14727	AGACTCAAGYCTGCCAGTTTCAAATGCAGKTCCCAGGKT AAGCCCGGGGATTTCACATCTGACTTAACAGACCGCCTG CGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAAACGCTTGCAC CCTCCGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGT GCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCACTGCGGTTATTAAC CACAATGCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCG AAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTT GCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAG GAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGGTCATC CTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGGGCCGT TACCCCGCCTACTAGCTAATCCCATCTGGGTTTCATCCGAT AGTGAGAGGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCGAC GTYATGCGGTATTAGCCACCGTTTCCAGTGGTTATCCCCC TCTATCGGGCAGATCCCCAGACATTACTCACCCGTCCGCC ACTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGTCCGA CTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCARCGTTCAATCTGAGC CAGGATCAAACTCT

В результате проведенных исследований, были идентифицированы и депонированы 5 перспективных штаммов ризобактерий, выделенных из яровой

мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс: № 26 – *Bacillus thuringiensis* B-14700, № 29 – *Bacillus subtilis* B-14701, № 31 – *Raoultella ornithinolytica* B-14725, № 35 – *Pantoea agglomerans* B-14726, № 36 – *Pantoea vagans* B-14727. Паспорта депонированных штаммов ризобактерий представлены в Приложении В.

3.4 Заключение по главе 3

В рамках проведенных исследований осуществлен скрининг перспективных штаммов ризобактерий, демонстрирующих потенциал для создания эффективных биопрепаратов для сельского хозяйства.

Первоначальный скрининг 42 штаммов, устойчивых к абиотическому стрессу, позволил выделить 11 наиболее перспективных на основе анализа ростостимулирующих свойств. Оценка включала определение антиоксидантной активности, продукции фитогормонов, способности к солубилизации фосфатов и фиксации азота.

Дальнейшее изучение антагонистической активности отобранных штаммов против фитопатогенов *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokiniana* и *Botrytis cinerea* выявило штаммы с выраженными антагонистическими свойствами.

В результате комплексного скрининга отобраны, идентифицированы и депонированы 5 штаммов ризобактерий: *Bacillus thuringiensis* B-14700 (№ 26), *Bacillus subtilis* B-14701 (№ 29), *Raoultella ornithinolytica* B-14725 (№ 31), *Pantoea agglomerans* B-14726 (№ 35) и *Pantoea vagans* B-14727 (№ 36).

Указанные штаммы обладают комплексом биотехнологически значимых свойств, включающим ростостимулирующую и антагонистическую активность, что определяет их как перспективные объекты для дальнейшего изучения и разработки биопрепаратов для сельского хозяйства.

ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСОРЦИУМОВ РИЗОБАКТЕРИЙ

В главе представлены результаты конструирования бактериальных консорциумов на основе ризобактерий, исследования их ростостимулирующих свойств и антагонистической активности, оценки эффективности влияния на рост и развитие яровой мягкой пшеницы в лабораторном эксперименте.

4.1 Конструирование бактериальных консорциумов на основе перспективных ризобактерий

Первым этапом в создании бактериальных консорциумов является определение совместимости перспективных штаммов ризобактерий: *Bacillus thuringiensis* B-14700, *Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726, *Pantoea vagans* B-14727. Данный этап необходим для исключения антагонистических взаимодействий между компонентами консорциума, что позволит обеспечить стабильность и эффективность его функционирования. Для оценки биосовместимости штаммов использовался метод совместного культивирования на твердой питательной среде. Оценивалось наличие или отсутствие зоны ингибирования роста одного штамма другим. Результаты представлены в таблице 4.1.1.

Анализ данных, представленных в таблице 4.1.1, выявил, что штамм *Bacillus thuringiensis* B-14700 оказывает ингибирующее воздействие на все остальные исследуемые штаммы, что свидетельствует о его антагонистической активности. Кроме того, большинство исследуемых штаммов, за исключением B-14725 (*Raoultella ornithinolytica*), также подавляли рост *Bacillus thuringiensis* B-14700. В связи с этим, *Bacillus thuringiensis* B-14700 был исключен из дальнейшего процесса конструирования консорциумов, чтобы избежать возможных негативных последствий для их стабильности и эффективности.

Таблица 4.1.1 – Результаты биосовместимости штаммов ризобактерий

Номера микроорганизмов					
	<i>Bacillus thuringiensis</i> B-14700	<i>Bacillus subtilis</i> B-14701	<i>Raoultella ornithinolytica</i> B-14725	<i>Pantoea agglomerans</i> B-14726	<i>Pantoea vagans</i> B-14727
<i>Bacillus thuringiensis</i> B-14700		–	–	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> B-14701	–		+	+	+
<i>Raoultella ornithinolytica</i> B-14725	+	+		+	+
<i>Pantoea agglomerans</i> B-14726	–	+	+		+
<i>Pantoea vagans</i> B-14727	–	+	+	+	
«+» – отсутствует зона ингибирования роста тест-штамма, «–» – присутствует зона ингибирования роста тест-штамма					

На основании результатов оценки биосовместимости были сформированы 10 вариантов консорциумов, включающих штаммы *Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726 и *Pantoea vagans* B-14727. Разнообразие составов консорциумов позволило оценить вклад каждого штамма и их комбинаций в стимуляцию роста растений и подавление фитопатогенов. Состав консорциумов представлен в таблице 4.1.2.

Таблица 4.1.2 – Варианты консорциумов ризобактерий

№	Состав и соотношение штаммов ризобактерий
1	<i>B. subtilis</i> B-14701 и <i>R. ornithinolytica</i> B-14725 в соотношении 1:1
2	<i>B. subtilis</i> B-14701 и <i>P. agglomerans</i> B-14726 в соотношении 1:1
3	<i>B. subtilis</i> B-14701 и <i>P. vagans</i> B-14727 в соотношении 1:1
4	<i>B. subtilis</i> B-14701, <i>R. ornithinolytica</i> B-14725 и <i>P. agglomerans</i> B-14726 в соотношении 1:1:1
5	<i>B. subtilis</i> B-14701, <i>R. ornithinolytica</i> B-14725 и <i>P. vagans</i> B-14727 в соотношении 1:1:1
6	<i>B. subtilis</i> B-14701, <i>P. agglomerans</i> B-14726 и <i>P. vagans</i> B-14727 в соотношении 1:1:1
7	<i>R. ornithinolytica</i> B-14725 и <i>P. agglomerans</i> B-14726 в соотношении 1:1
8	<i>R. ornithinolytica</i> B-14725 и <i>P. vagans</i> B-14727 в соотношении 1:1
9	<i>P. agglomerans</i> B-14726 и <i>P. vagans</i> B-14727 в соотношении 1:1
10	<i>R. ornithinolytica</i> B-14725, <i>P. agglomerans</i> B-14726 и <i>P. vagans</i> B-14727 в соотношении 1:1:1

После формирования консорциумов был проведен ряд исследований по определению их ростостимулирующих свойств, антагонистической активности и эффективности влияния на рост и развитие яровой мягкой пшеницы в лабораторном эксперименте. Подробное описание результатов исследований представлено в последующих разделах данной главы.

4.2 Скрининг перспективных бактериальных консорциумов ризобактерий с биотехнологически ценными свойствами

На этапе отбора наиболее перспективных консорциумов для дальнейших исследований был проведен скрининг по ряду ключевых биотехнологически значимых признаков. В частности, оценивались ростостимулирующие свойства, включающие антиоксидантную активность, способность продуцировать фитогормоны (индолил-3-уксусную кислоту и гиббереллиновую кислоту), фиксировать атмосферный азот, проявлять антагонистическую активность в отношении фитопатогенов зерновых культур. Полученные результаты исследования систематизированы и представлены на рисунках 4.2.1–4.2.7.

Полученные результаты демонстрируют значительную вариабельность ростостимулирующих свойств исследуемых консорциумов ризобактерий. В ряде случаев наблюдается синергический эффект, проявляющийся в увеличении ростостимулирующих свойств по сравнению со средними значениями, полученными для отдельных ризобактерий, входящих в их состав.

Так, консорциумы № 2, № 3, № 4, № 6, № 9 и № 10 показали значительно более высокую способность к синтезу индолил-3-уксусной кислоты, чем средние показатели по штаммам ризобактерий (рисунок 4.2.2). Например, консорциум № 9 продуцировал 12,59 мг/мл ИУК, что на 43 % выше среднего показателя (8,78 мг/мл) для входящих в его состав ризобактерий. Это указывает на положительное взаимодействие между компонентами консорциума, приводящее к усилению синтеза данного фитогормона.

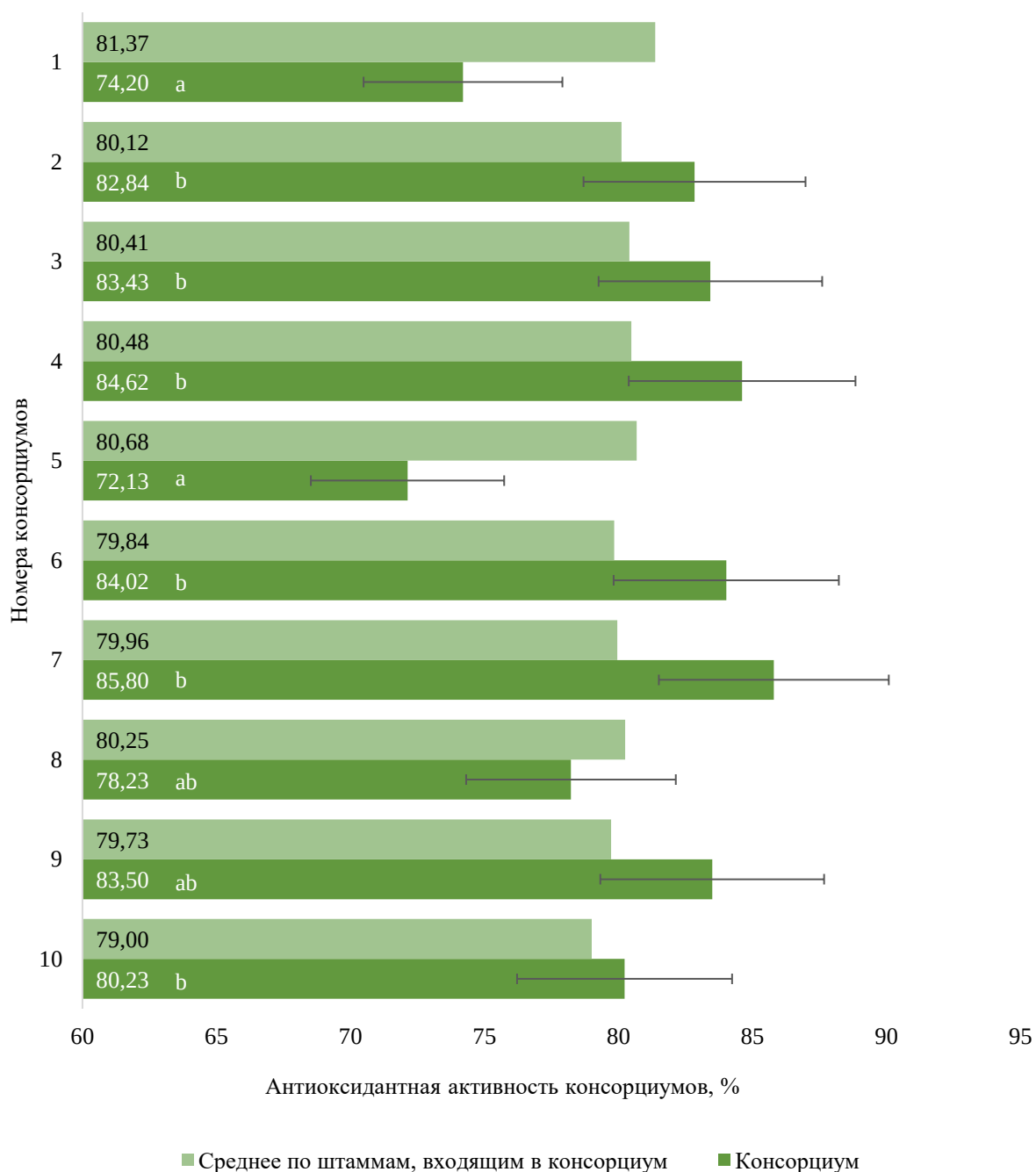


Рисунок 4.2.1 – Результаты антиоксидантной активности консорциумов с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

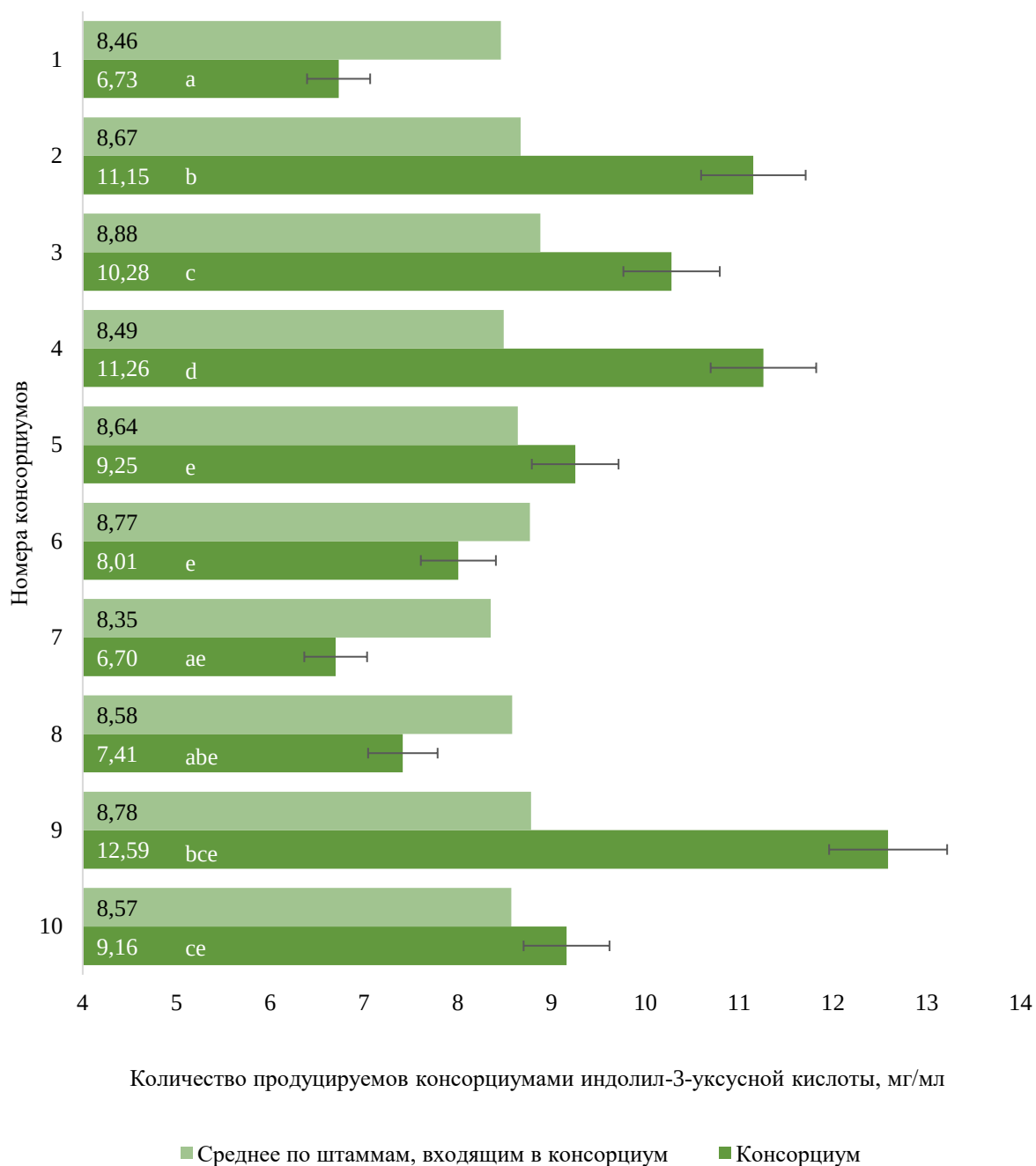


Рисунок 4.2.2 – Количество продуцируемой ИУК консорциумов с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

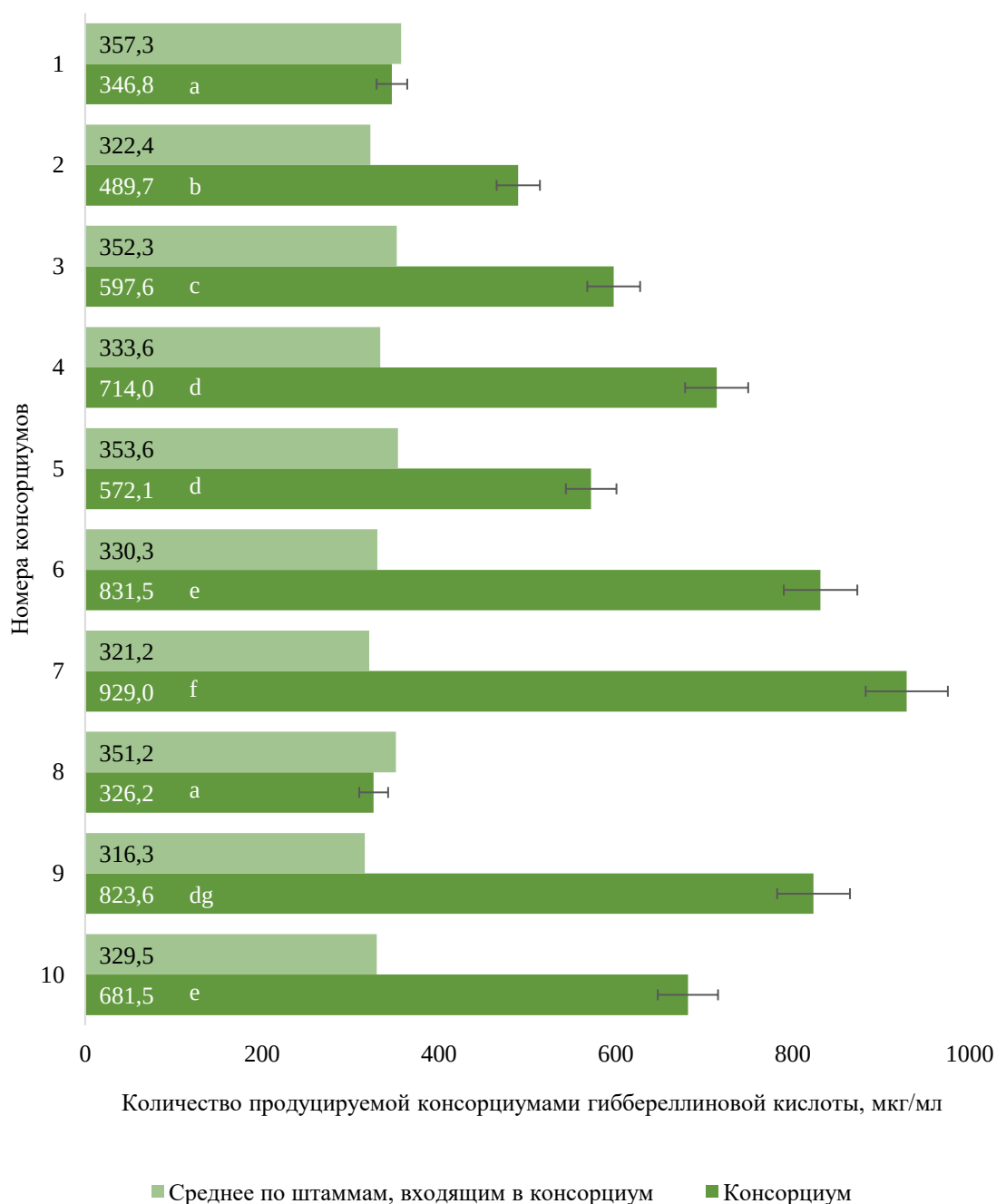


Рисунок 4.2.3 – Количество продуцируемой ГК консорциумов с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

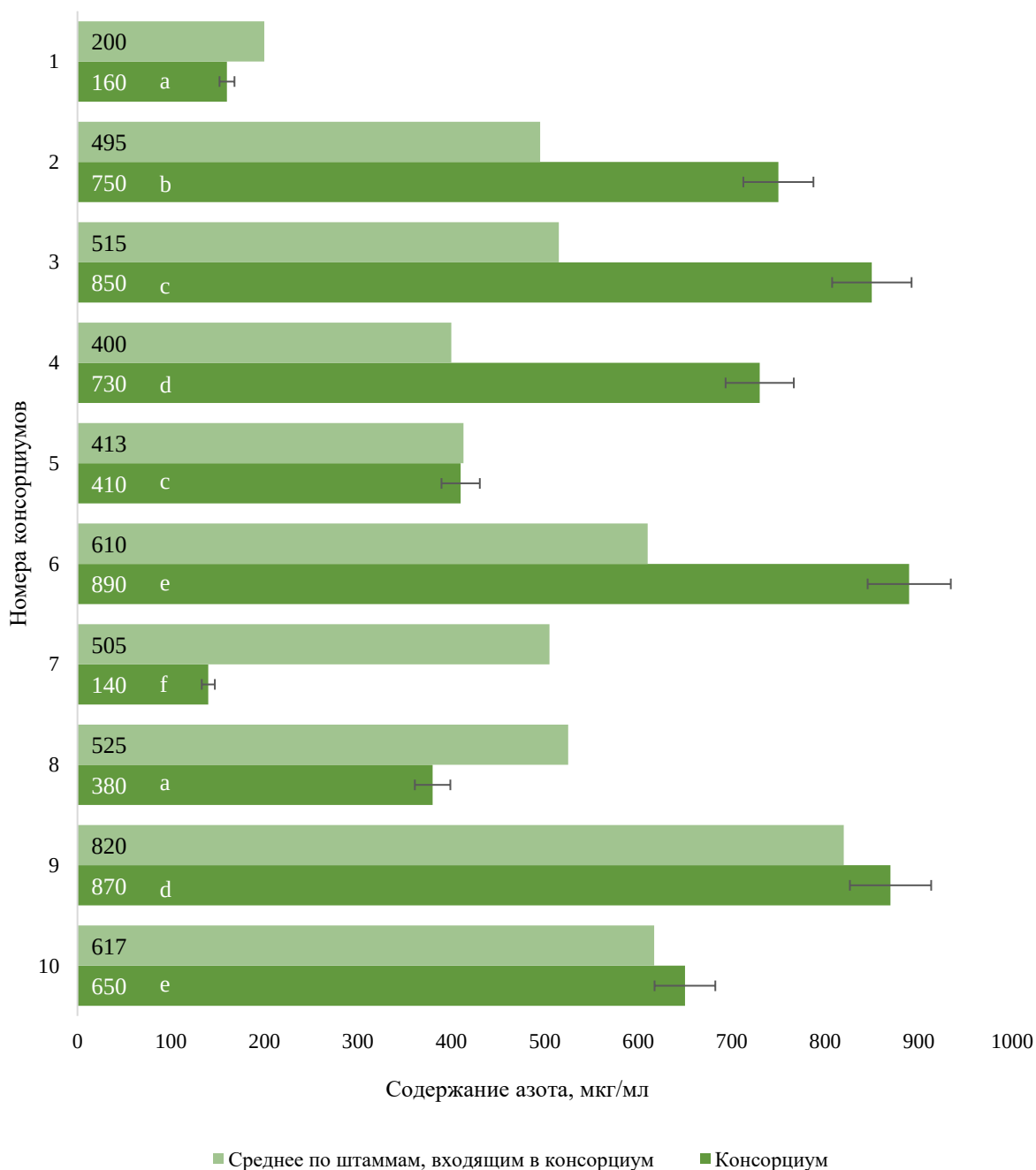


Рисунок 4.2.4 – Способность к фиксированию азота консорциумами с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

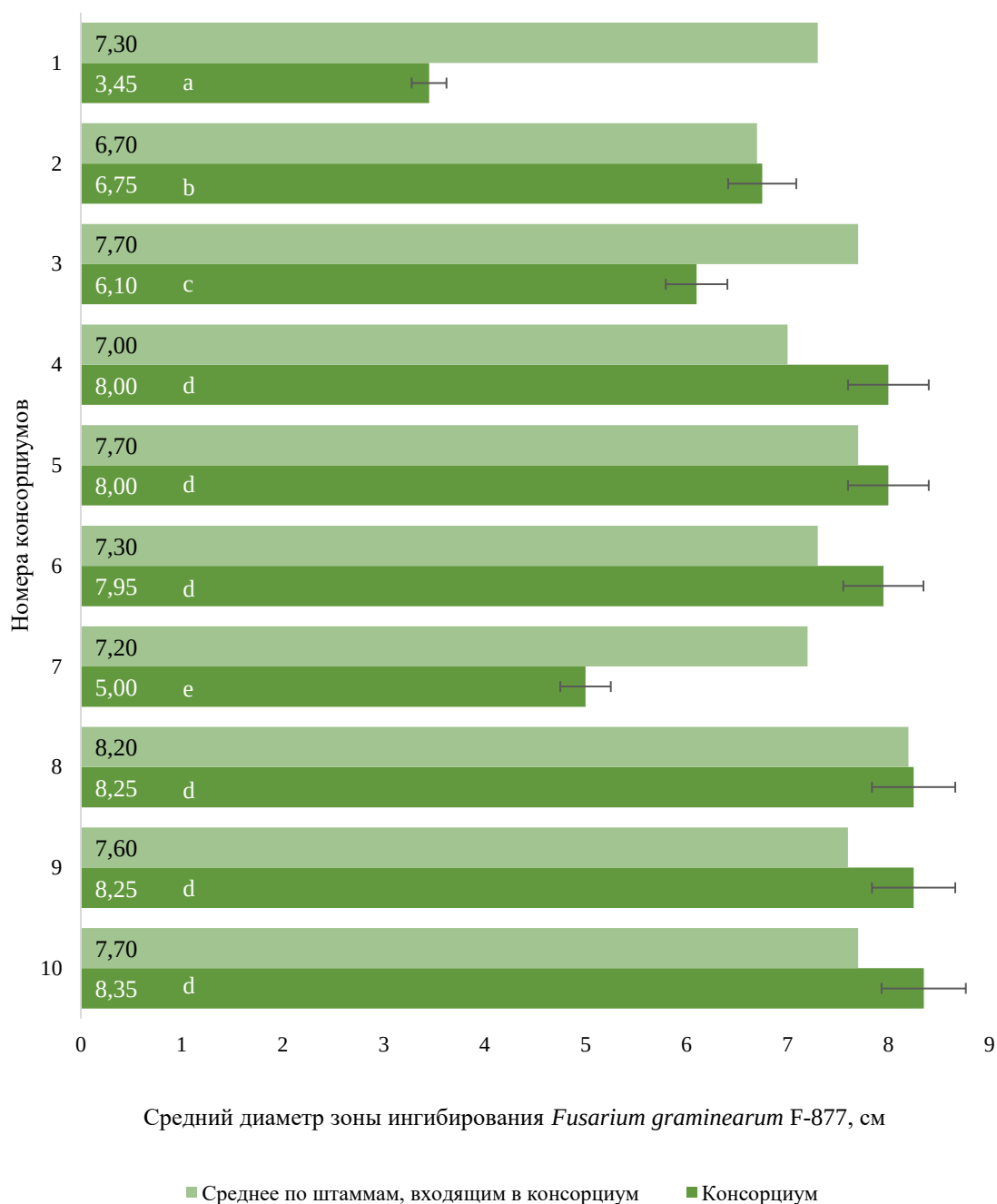


Рисунок 4.2.5 – Антагонистическая активность консорциумов в отношении *Fusarium graminearum* F-877 с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

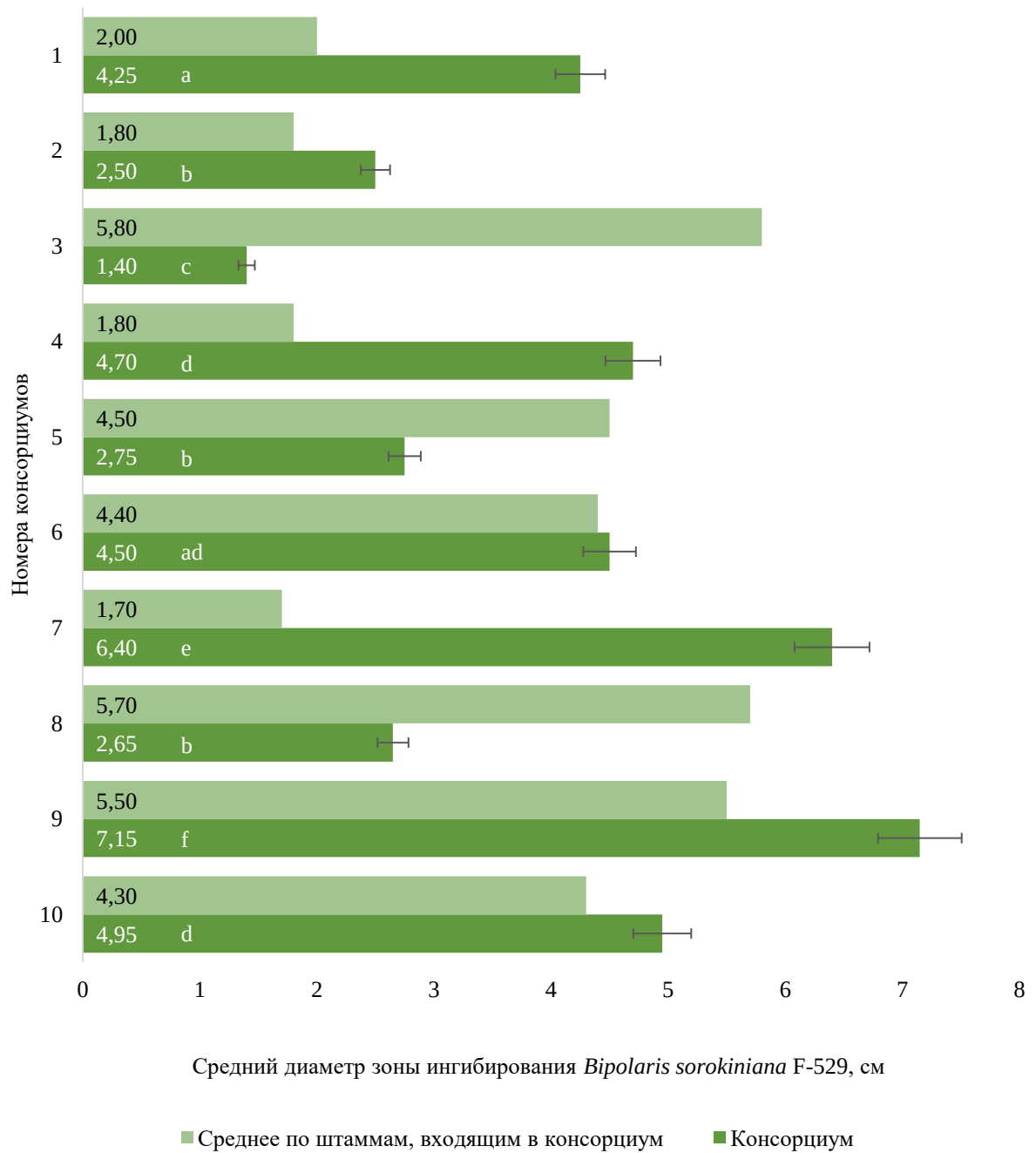


Рисунок 4.2.6 – Антагонистическая активность консорциумов в отношении *Bipolaris sorokiniana* F-529 с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

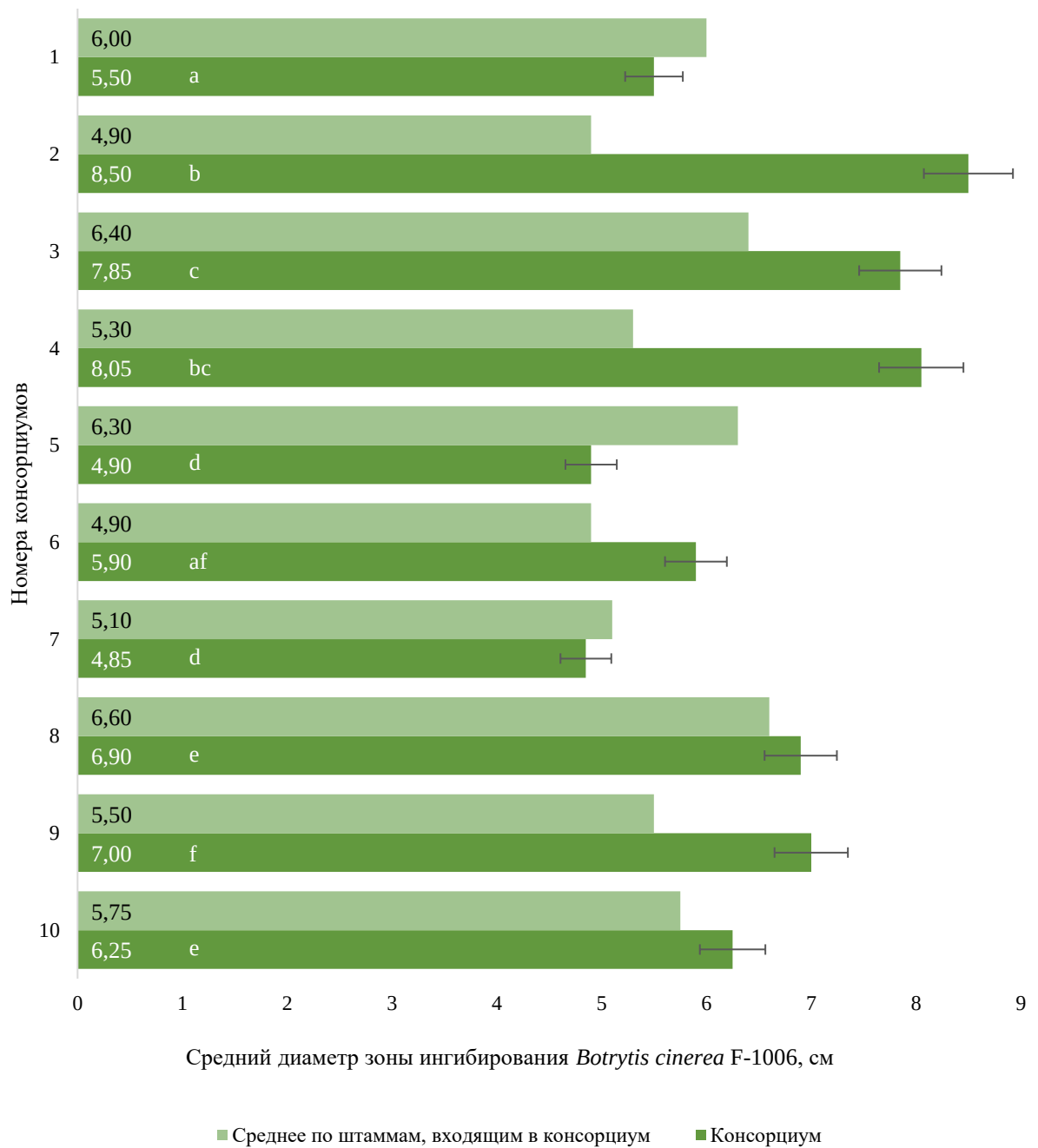


Рисунок 4.2.7 – Антагонистическая активность консорциумов в отношении *Botrytis cinerea* F-1006 с планкой погрешности процент: буквенные индексы, расположенные справа от значений, показывают достоверность различий между консорциумами (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе (при отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков)

Таблица 4.2.1 – Результаты ранжирования свойств консорциумов

№	АОА	ИУК	ГК	Азот	F-877	F-529	F-1006
Балл							
1	0	0	0	0	0	3	0
2	4	2	2	3	4	2	4
3	3	3	3	3	0	0	4
4	4	3	3	3	4	3	4
5	3	0	3	0	4	0	0
6	0	3	4	4	4	3	3
7	0	3	5	0	0	3	0
8	0	0	0	0	4	0	4
9	4	1	3	3	4	4	3
10	3	3	4	3	4	3	4
Ранг							
1	0,00	0,0	0,0	0,00	0	0,6	0,00
2	0,10	0,8	0,2	0,15	1	0,4	0,60
3	0,15	0,6	0,3	0,15	0	0,0	0,60
4	0,15	0,8	0,3	0,15	1	0,6	0,60
5	0,00	0,6	0,3	0,00	1	0,0	0,00
6	0,15	0,0	0,4	0,20	1	0,6	0,45
7	0,15	0,0	0,5	0,00	0	0,6	0,00
8	0,00	0,0	0,0	0,00	1	0,0	0,60
9	0,05	0,8	0,3	0,15	1	0,8	0,45
10	0,15	0,6	0,4	0,15	1	0,6	0,60

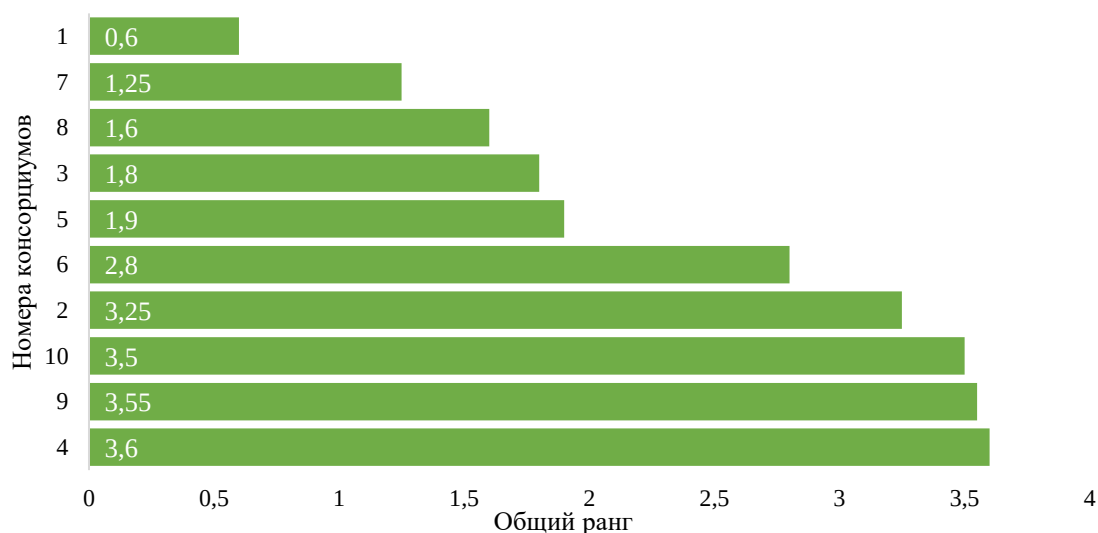


Рисунок 4.2.8 – Общий ранг бактериальных консорциумов

Аналогичная тенденция наблюдается и в отношении продуцирования гиббереллиновой кислоты (рисунок 4.2.3). Консорциумы № 3, № 4, № 6, № 7,

№ 9 и № 10 превосходят по этому показателю средние значения по штаммам в 1,5–3 раза. В частности, консорциум № 7 продуцировал 929 мкг/мл гиббереллиновой кислоты, что в 2,9 раза выше среднего показателя для входящих в его состав штаммов (321 мкг/мл). Данный факт свидетельствует о значительном усилении синтеза гиббереллинов при взаимодействии ризобактерий в составе консорциума.

Повышение антиоксидантной активности по сравнению со средними показателями по штаммам наблюдалось у консорциумов № 2, № 3, № 4, № 6, № 7, № 9 и № 10 (рисунок 4.2.1). Максимальное значение активности было зарегистрировано у консорциума № 7 (85,8 %).

Значительное увеличение способности к фиксации атмосферного азота по сравнению со средними показателями по штаммам продемонстрировали консорциумы № 2, № 3, № 4, № 6, № 9 и № 10 (рисунок 4.2.4). Наибольшее значение было зафиксировано у консорциума № 6 (890 мкг/л), что на 45 % выше, чем среднее значение для входящих в его состав штаммов (610 мкг/л).

Результаты оценки антагонистической активности консорциумов ризобактерий в отношении фитопатогенных грибов также свидетельствуют о синергетическом эффекте при конструировании консорциумов. Большинство консорциумов показали более выраженную антагонистическую активность в отношении *Fusarium graminearum* F-877 по сравнению со средними значениями по штаммам (рисунок 4.2.5). Наибольший диаметр зоны ингибирования наблюдался у консорциума № 10 (8,35 см), что несколько выше среднего показателя по штаммам (7,70 см). Особенно выраженный синергетический эффект наблюдался в отношении *Bipolaris sorokiniana* F-529. Консорциумы № 7 и № 9 продемонстрировали значительно большую антагонистическую активность, чем средние показатели по штаммам (рисунок 4.2.6). В частности, консорциум № 9 ингибировал рост *B. sorokiniana* F-529 с диаметром зоны ингибирования 7,15 см, что на 30 % больше, чем среднее значение для входящих в его состав ризобактерий (5,50 см). Практически все консорциумы показали более высокую антагонистическую активность в отношении *Botrytis cinerea* F-1006 по сравнению со средними показателями по штаммам (рисунок 4.2.7). Наибольший эффект был

зафиксирован у консорциума № 2 (8,50 см), что значительно превышает среднее значение для штаммов (4,90 см).

Проведенный скрининг консорциумов ризобактерий выявил ряд перспективных вариантов, обладающих выраженными ростостимулирующими и антагонистическими свойствами. Результаты исследований, представленные в таблице 4.2.1 и на рисунках 4.2.1–4.2.8, показали, что конструирование консорциумов позволяет достичь синергетического эффекта, значительно увеличивающего биотехнологически ценные свойства ризобактерий по сравнению с их использованием в виде монокультур. Наиболее перспективными для дальнейших исследований в лабораторной апробации на модельной культуре (яровой мягкой пшенице) представляются консорциумы с общим рангом 3,5 и более: № 4 (3,6), № 9 (3,55) и № 10 (3,5), продемонстрировавшие высокий уровень ростостимулирующей и антагонистической активности. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение эффективности влияния отобранных консорциумов ризобактерий на рост и развитие яровой мягкой пшеницы в лабораторном эксперименте.

4.3 Оценка эффективности влияния консорциумов на рост и развитие пшеницы в условиях биотического стресса

В рамках диссертационной работы была проведена оценка влияния разработанных консорциумов ризобактерий, отобранных по комплексу признаков, включающих ростостимулирующую активность и антагонистические свойства – консорциум № 4 (*Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726), № 9 (*Pantoea agglomerans* B-14726 и *Pantoea vagans* B-14727), № 10 (*Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726 *Pantoea vagans* B-14727), на показатели роста и развития яровой мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс в условиях искусственно созданного биотического стресса.

Экспериментальные исследования проводились в лабораторных условиях на семенах яровой мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс. Варианты обработки семян пшеницы представлены в таблице 4.3.1.

Таблица 4.3.1 – Варианты обработки семян пшеницы

Опыт	Описание
Вариант 1.1	Контроль
Вариант 1.2	Обработка фитопатогеном
Вариант 2.1	Обработка штаммом <i>Bacillus subtilis</i> B-14701
Вариант 2.2	Обработка штаммом <i>Raoultella ornithinolytica</i> B-14725
Вариант 2.3	Обработка штаммом <i>Pantoea agglomerans</i> B-14726
Вариант 2.4	Обработка штаммом <i>Pantoea vagans</i> B-14727
Вариант 3.1	Обработка консорциумом № 4
Вариант 3.2	Обработка консорциумом № 9
Вариант 3.3	Обработка консорциумом № 10
Вариант 4.1	Обработка штаммом <i>B. subtilis</i> B-14701 и фитопатогеном
Вариант 4.2	Обработка штаммом <i>R. ornithinolytica</i> B-14725 и фитопатогеном
Вариант 4.3	Обработка штаммом <i>P. agglomerans</i> B-14726 и фитопатогеном
Вариант 4.4	Обработка штаммом <i>P. vagans</i> B-14727 и фитопатогеном
Вариант 5.1	Обработка консорциумом № 4 и фитопатогеном
Вариант 5.2	Обработка консорциумом № 9 и фитопатогеном
Вариант 5.3	Обработка консорциумом № 10 и фитопатогеном

Эксперимент включал в себя оценку ряда ключевых показателей, характеризующих рост и развитие проростков пшеницы, таких как всхожесть семян, длина ростка и корня, а также содержание основных пигментов фотосинтеза (хлорофилл а, хлорофилл b и каротиноиды) в проростках. Результаты, полученные в ходе исследования, представлены в таблице 4.3.2.

Внесение фитопатогенов (Вариант 1.2) приводило к существенному снижению всхожести семян (на 10– 17 %), уменьшению длины ростка (на 12– 19 %) и длины корня (на 17–21 %) по сравнению с контролем (Вариант 1.1) в зависимости от конкретного вида фитопатогена. Также наблюдалось снижение содержания хлорофилла а и b, а также каротиноидов, что свидетельствует об угнетении фотосинтетической активности растений под воздействием биотического стресса.

Обработка семян отдельными штаммами ризобактерий (Варианты 2.1–2.4) оказывала положительное влияние на рост и развитие проростков. Всхожесть семян увеличивалась на 4–12 %, длина ростка на 6–11 %, а длина корня на 6–15 % по сравнению с контролем (Вариант 1.1). Отмечено также повышение содержания хлорофилла а (на 2–14 %), хлорофилла b (на 6–35 %) и каротиноидов (на 14–50 %). Наиболее выраженный эффект оказывал штамм *Pantoea vagans* B-14727 (Вариант 2.4).

Использование консорциумов ризобактерий (Варианты 3.1–3.3) продемонстрировало более высокую эффективность по сравнению с применением отдельных штаммов. Всхожесть семян увеличивалась на 15–24 %, длина ростка на 14–20 %, а длина корня на 18–27 % по сравнению с контролем (Вариант 1.1). Наблюдалось значительное увеличение содержания хлорофилла а (на 17–24 %), хлорофилла b (на 37–41 %) и каротиноидов (на 54–55 %). Наилучшие результаты были получены при использовании консорциума № 9 (Вариант 3.2).

Предварительная обработка семян ризобактериями или консорциумами, а затем инфицирование фитопатогенами (Варианты 4.1–4.4 и 5.1–5.3) позволяли частично компенсировать негативное воздействие последних. В частности, наблюдалось повышение всхожести семян (на 5–16 % по сравнению с Вариантом 1.2), увеличение длины ростка (на 3–16 %) и длины корня (на 4–29 %), а также содержания хлорофилла и каротиноидов. Наиболее выраженный защитный эффект проявлялся при использовании консорциума № 9 (Вариант 5.2), что выражалось в максимальных показателях роста и развития проростков в условиях биотического стресса. В некоторых случаях (вариант 5.3–1, 5.3–2 и 5.3–3) значения показателей были сопоставимы с контрольным значением (Вариант 1.1).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о перспективности использования ризобактерий и их консорциумов в качестве эффективного средства защиты растений пшеницы от биотического стресса. Установлено, что применение ризобактерий способствует повышению всхожести семян, стимуляции роста и развития проростков, а также увеличению содержания фотосинтетических пигментов, что в конечном итоге приводит к повышению устойчивости растений к воздействию фитопатогенов.

Таблица 4.3.2 – Характеристика яровой мягкой пшеницы Сибирский Альянс в условиях биотического стресса

Опыт	Всхожесть, %	Длина ростка, мм	Длина корня, мм	Хлорофилл а, мг/г	Хлорофилл в, мг/г	Каротиноиды, мг/г
Контроль						
Вариант 1.1	74±2	134±5	81±4	1,48±0,02	0,68±0,02	1,10±0,04
Вариант 2.1	78±1	142±4	86±2	1,51±0,03	0,76±0,01	1,39±0,03
Вариант 2.2	79±3	145±5	89±3	1,63±0,01	0,72±0,01	1,25±0,02
Вариант 2.3	81±1	146±2	91±1	1,58±0,02	0,86±0,02	1,52±0,03
Вариант 2.4	86±1	149±3	93±2	1,68±0,01	0,92±0,01	1,65±0,01
Вариант 3.1	85±2	153±1	96±4	1,73±0,03	0,93±0,02	1,69±0,03
Вариант 3.2	92±2	160±4	103±5	1,83±0,03	0,96±0,01	1,71±0,03
Вариант 3.3	87±4	156±2	98±3	1,79±0,02	0,95±0,01	1,67±0,02
<i>Fusarium graminearum</i> F-877 (1)						
Вариант 1.2-1	63±3	118±4	68±3	1,19±0,02	0,54±0,01	1,00±0,01
Вариант 4.1-1	68±2	121±3	71±3	1,25±0,03	0,55±0,02	1,06±0,01
Вариант 4.2-1	69±2	128±4	73±2	1,29±0,01	0,59±0,02	1,12±0,01
Вариант 4.3-1	74±3	134±2	74±2	1,34±0,02	0,57±0,01	1,19±0,01
Вариант 4.4-1	79±1	139±3	76±1	1,40±0,03	0,60±0,03	1,25±0,02
Вариант 5.1-1	76±2	146±3	79±3	1,42±0,01	0,63±0,02	1,29±0,01
Вариант 5.2-1	83±2	159±6	91±3	1,44±0,02	0,73±0,01	1,42±0,02
Вариант 5.3-1	79±1	151±3	85±4	1,41±0,01	0,68±0,01	1,35±0,01
<i>Bipolaris sorokiniana</i> F-529 (2)						
Вариант 1.2-2	67±3	115±5	64±3	1,23±0,03	0,49±0,01	1,01±0,02
Вариант 4.1-2	68±2	116±5	69±3	1,25±0,02	0,51±0,02	1,09±0,03
Вариант 4.2-2	71±2	123±4	73±2	1,37±0,02	1,56±0,01	1,16±0,02
Вариант 4.3-2	76±1	118±3	74±2	1,31±0,03	1,60±0,01	1,28±0,03
Вариант 4.4-2	82±2	127±5	79±1	1,42±0,01	0,63±0,02	1,34±0,04
Вариант 5.1-2	83±3	128±5	80±4	1,43±0,01	0,65±0,02	1,38±0,01
Вариант 5.2-2	85±1	140±5	102±5	1,48±0,03	0,78±0,01	1,48±0,01
Вариант 5.3-2	83±1	135±5	98±4	1,45±0,04	0,72±0,01	1,45±0,02

Продолжение таблицы 4.3.2

Опыт	Всхожесть, %	Длина ростка, мм	Длина корня, мм	Хлорофилл а, мг/г	Хлорофилл в, мг/г	Каротиноиды, мг/г
<i>Botrytis cinerea</i> F-1006 (3)						
Вариант 1.2-3	65±1	109±6	63±2	1,20±0,03	0,51±0,01	0,98±0,01
Вариант 4.1-3	75±2	112±6	67±3	1,25±0,02	0,53±0,02	1,06±0,02
Вариант 4.2-3	68±1	115±2	70±2	1,34±0,01	0,58±0,02	1,13±0,02
Вариант 4.3-3	76±1	118±1	73±1	1,28±0,01	0,54±0,01	1,27±0,01
Вариант 4.4-3	80±2	121±3	75±3	1,39±0,03	0,59±0,02	1,31±0,03
Вариант 5.1-3	81±2	126±6	79±3	1,41±0,02	0,62±0,01	1,39±0,02
Вариант 5.2-3	84±2	149±4	92±2	1,45±0,03	0,71±0,02	1,42±0,03
Вариант 5.3-3	81±1	131±3	86±2	1,44±0,01	0,67±0,02	1,34±0,01

Установлено, что применение ризобактерий способствует повышению всхожести семян, стимуляции роста и развития проростков, а также увеличению содержания фотосинтетических пигментов, что в конечном итоге приводит к повышению устойчивости растений к воздействию фитопатогенов.

Консорциумы ризобактерий продемонстрировали более высокую эффективность по сравнению с применением отдельных штаммов, что может быть обусловлено синергическим взаимодействием микроорганизмов, входящих в состав консорциума. Полученные данные позволяют рекомендовать дальнейшие исследования по изучению механизма действия ризобактерий и разработке эффективных биопрепаратов сельского хозяйства. Учитывая совокупность полученных данных, консорциум № 9, состоящий из штаммов ризобактерий *P. agglomerans* B-14726 и *P. vagans* B-14727 в соотношении 1:1, был выбран в качестве основы разрабатываемого препарата «БП-010». Для штаммов, входящие в состав препарата «БП-010» осуществляли биоинформатический анализ кластеров генов, ответственных за ростостимулирующие и антагонистические свойства. Также штаммы исследовали на наличие цитотоксических свойств.

4.4 Биоинформатический анализ кластеров генов

Биоинформатический анализ позволяет идентифицировать гены и функциональные кластеры генов, определяющие физиологические свойства микроорганизмов и биосинтез вторичных метаболитов. Для проведения данного анализа проведено секвенирование генома.

Из бактериальных штаммов с помощью набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit была выделена ДНК. Спектрофотометрический анализ показал классический спектр поглощения ДНК, что говорит о достаточном качестве и количестве выделенной ДНК для создания из неё библиотек (таблица 4.4.1).

Таблица 4.4.1 – Результаты флуориметрического анализа на Qubit концентраций выделенной бактериальной ДНК

Образец	ДНК, нг/мкл	ДНК, мкг
<i>Pantoea agglomerans</i> B-14726	112	3,9
<i>Pantoea vagans</i> B-14727	133	4,6

Для приготовления библиотек для MGISEQ ДНК предварительно фрагментировали ультразвуком на Covaris S2. Далее с помощью наборов NEBNext Ultra II DNA library prepkit готовили ДНК-библиотеки. Распределения длин получалось в диапазон 200–700 п.н., что соответствует необходимым размерам при секвенировании на платформе MGISEQ-2000. Библиотеки квантифицировали на Qubit, смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на геномном секвенаторе MGISEQ-2000 с длиной прочтений 2x100 нт.

В случае Polyseq фрагментация не проводилась и бралась исходная ДНК. На первом этапе с помощью набора Barcode Library Preparation Kit проводилось лигирование адаптеров, содержащих уникальные баркоды для каждого образца. Далее полученные библиотеки эквимольно смешивались и проводился второй этап присоединения адаптеров с помощью Ligation Barcode Kit. Полученная суммарная ДНК-библиотека секвенировалась на платформе Polyseq One. В таблице 4.4.2 содержится обобщенная информация об объемах данных, полученных в результате высокопроизводительного секвенирования на обеих платформах.

Таблица 4.4.2 – Результаты геномного секвенирования бактериальных штаммов на платформах MGISEQ-2000 и Polyseq

Образец	MGISEQ		Polyseq	
	Кол-во ридов, млн	Объем данных, Мб	Кол-во ридов, млн	Объем данных, Мб
<i>Pantoea agglomerans</i> B-14726	2,0	197	307,0	2775
<i>Pantoea vagans</i> B-14727	6,0	602	341,7	3145

Полученные на Polyseq One длинные прочтения фильтровались по качеству Fitlong и далее использовались для *de novo* сборки тремя ассемблерами (Flye, Minipolish и Raven). С помощью Truscycler все полученные сборки контигов кластеризовали, выравнивали и получали консенсус генома для каждого бактериального штамма. Для всех двух штаммов получилось собрать кольцевые хромосомы.

Известно, что качество длинных прочтений, получаемых на платформах типа Polyseq, пока более низкое по сравнению с данными, генерируемыми на секвенаторах Illumina и MGI. Поэтому далее проводили исправление ошибок геномов в два этапа.

На первом этапе использовали длинные прочтения Polyseq и программу Medaka, а на втором этапе корректировку проводили программами Polypolish и POLCA с предварительно подготовленными прочтениями MGISEQ. Последние получали путем фильтрации по качеству ($Q>30$) с одновременным удалением адаптерных последовательностей программой Cutadapt. Более 70 % используемых ридов имело качество $Q>30$ (таблица 4.3). В результате исправления ошибок было отредактировано более 1000 ошибок, в том числе скорректировалась (увеличилась) длина геномов на 599–5102 нуклеотидов (таблица 4.4.3).

Таблица 4.4.3 – Результаты *de novo* сборки и аннотации геномов

Образец	B-14726	B-14727
Геном до исправления ошибок	4 733 956	4 871 944
Геном после исправления ошибок	4 735 034	4 873 357
GC состав, %	53,0	53,0
CDS	4411	4512
Кластеров rPHK	7	7
tPHK	78	80
Ближайший гомолог по GTDB	<i>Pantoea allii</i>	

Качество сборки оценивали с помощью программы BUSCO по наличию однокопийных ортологов. У исследуемых штаммов найдены все 124 гена. Это указывает на высокое качество полученных геномов.

Для точной таксономической идентификации геномы были проанализированы программой GTDB-tk, которая проводит построение филогеномного дерева (рисунок 4.4.1) на основе выравнивания 120 консервативных бактериальных белков, полученных из более чем 80 тысяч геномов базы GTDB.

Далее была проведена аннотация собранных геномов с помощью программы Vakta. Значение GC-состава составлял около 53 %. Количество предсказанных кодирующих последовательностей (CDS) колебалось от 4411 до 4512, кластеров рРНК – 7, а тРНК – от 78 до 80.

Исследуемые штаммы классифицированы как *Pantoea allii*:

- окраска по грамму: отрицательная;
- тип метаболизма: факультативной-анаэробная;
- основные особенности: ассоциирование с растениями;
- экологическая роль/источник: растения (*Allium* spp.), почва.

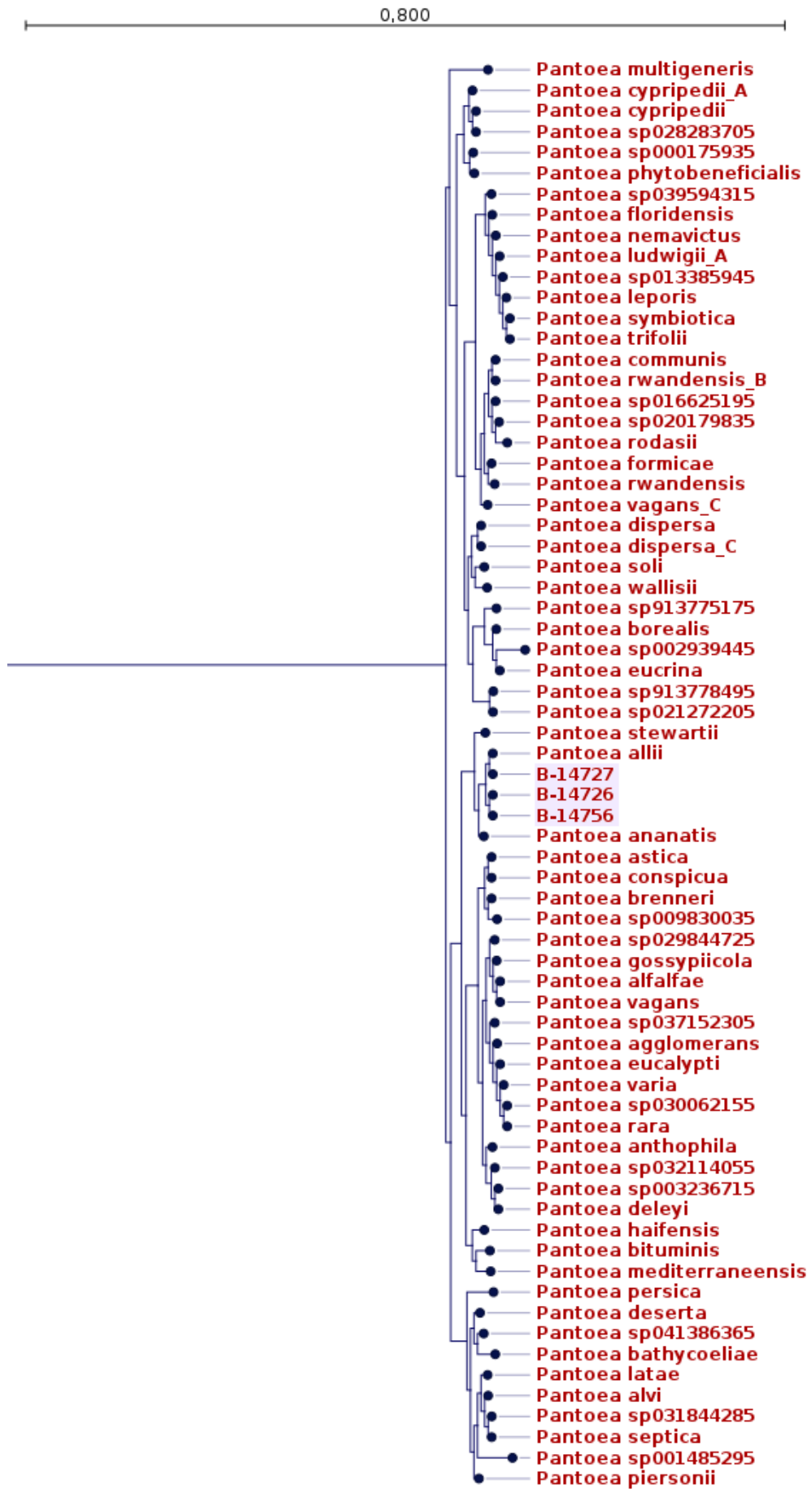
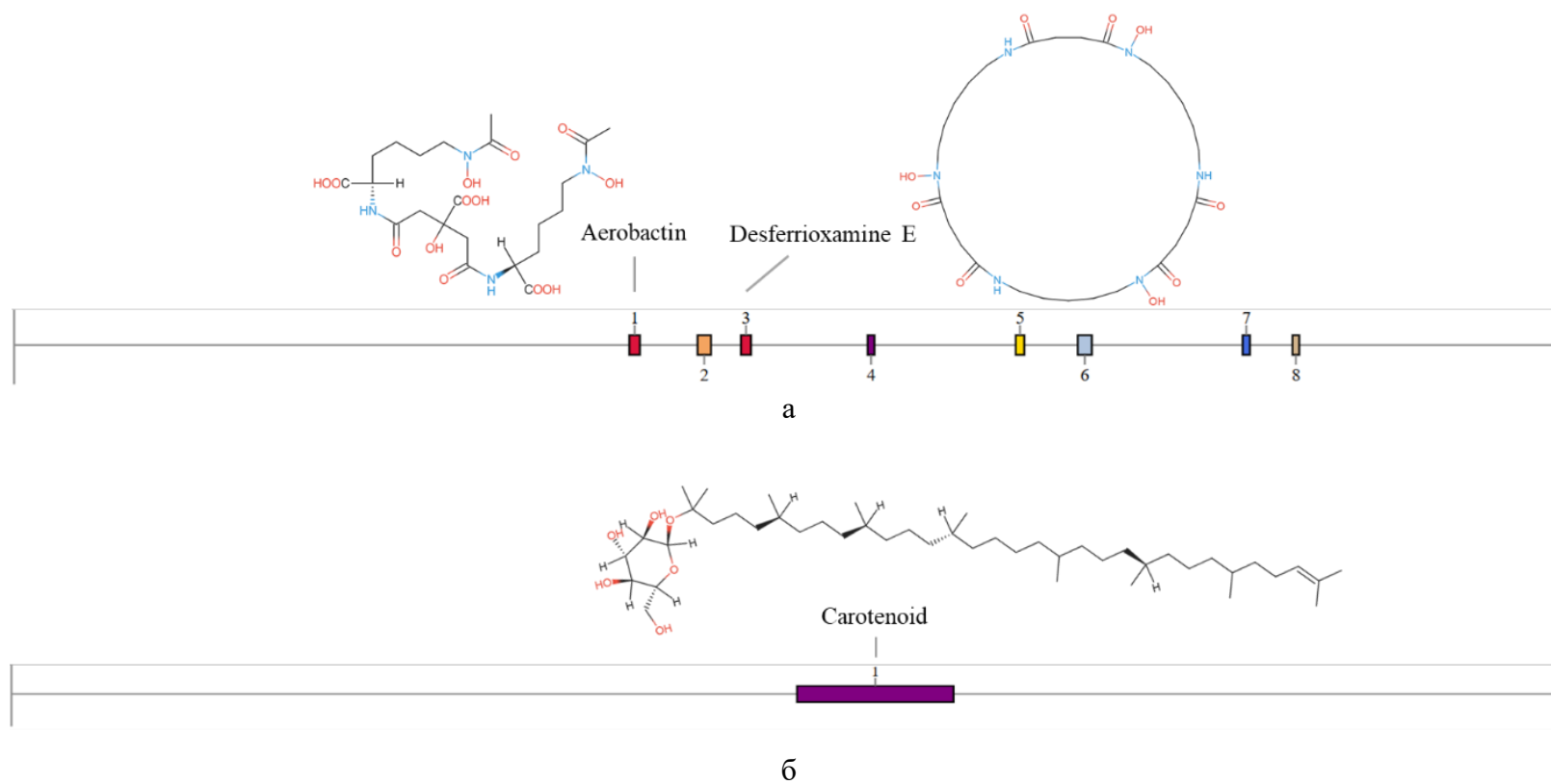


Рисунок 4.4.1 – Филогенетическое дерево исследуемых штаммов

Для оценки потенциала исследуемых штаммов к синтезу метаболитов, отвечающих за антагонистическую активность, геномные последовательности в формате GenBank импортировали в antiSMASH версии 8.0.4. Платформа antiSMASH является одним из наиболее широко используемых специализированных инструментов для идентификации и функционального анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов в бактериальных и грибковых геномах. На основе встроенных алгоритмов платформа выполнила автоматическое распознавание генетических кластеров, их классификацию и предсказание возможных продуктов биосинтеза, что позволило определить набор вторичных метаболитов, потенциально продуцируемых исследуемыми микроорганизмами [97].

Кластеры генов, представленные на рисунках и в таблицах, идентифицированы в геноме *Pantoea agglomerans* B-14726 (таблица 4.4.4 и рисунок 4.4.2) и *Pantoea vagans* B-14727 (таблица 4.4.5 и рисунок 4.4.3) с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4.

У всех исследуемых штаммов выявлены генные кластеры, ответственные за синтез аэробактина, десферриоксамина E и каротиноида. Аэробактин и десферриоксамин E относятся к сидерофорам, обеспечивающим захват и преобразование железа [164]. Каротиноид выполняет функцию антиоксидантов, защищая клетки от окислительного стресса и низких температур [115]. Особенностью штамма *Pantoea vagans* B-14727 является наличие дополнительных кластеров, связанных с биосинтезом зеамин, зеамин I, зеамин II, а также презеамин и презеамин I. Зеамин и презеамин представляют собой пептидные антибиотики с выраженной бактерицидной активностью [217].

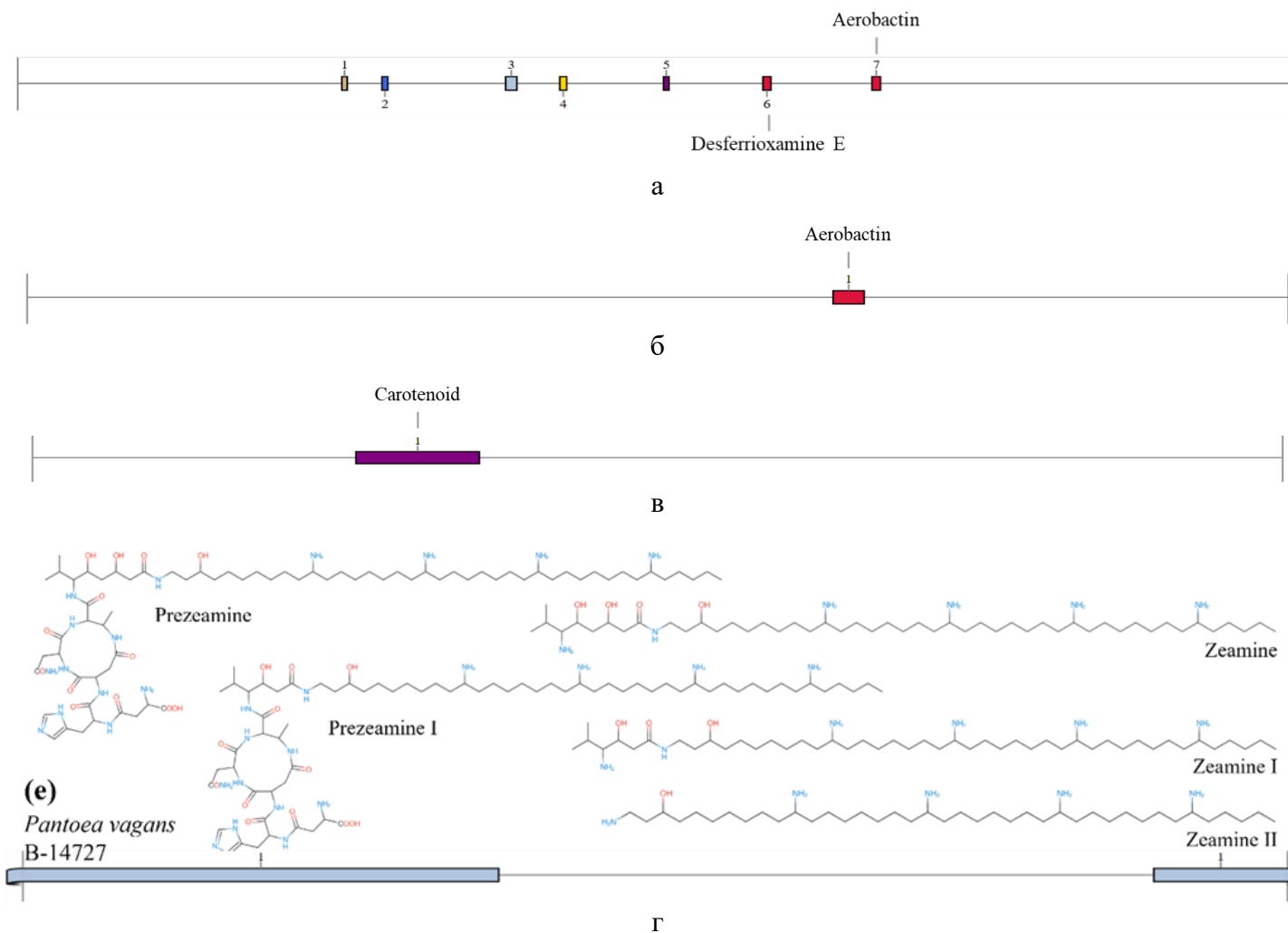


Примечание – а – contig_1; б – contig_2

Рисунок 4.4.2 – Кластеры генов, идентифицированные в геноме *Pantoea agglomerans* B-14726 с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4

Таблица 4.4.4 – Результаты анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов *Pantoea agglomerans* B-14726

Регион	Тип	Расположение на геноме, п.н.	Длина кластера, п.н.	Уровень сходства	Похожий известный кластер	Сравнение с базой MiBIG	Оценка сходства	Организм
contig_1								
1	Nl-siderophore	1881737–1914142	32,406	Высокий	aerobactin	BGC0001499.5	0,90	<i>Pantoea ananatis</i>
2	T3PKS	2090360–2131478	41,119	–	–	BGC0001987.2	0,49	–
3	Nl-siderophore	2223359–2253710	30,352	Высокий	desferrioxamine E	BGC0001572.3	0,85	<i>Pantoea agglomerans</i>
4	terpene-precursor	2610677–2631576	20,900	–	–	BGC0001361.3	0,50	–
5	azole-containing-RiPP	3063483–3089747	26,265	–	–	BGC0001285.5	0,31	–
6	NRPS, phosphonate	3253311–3296220	42,910	–	–	BGC0001859.4	0,36	–
7	redox-cofactor	3757746–3779911	22,166	–	–	BGC0001440.5	0,41	–
8	hserlactone	3910138–3930770	20,633	–	–	BGC0001928.2	0,46	–
contig_2								
1	terpene	129284–155045	25,762	Высокий	carotenoid	BGC0000638.3	0,89	<i>Pantoea ananatis</i>



Примечание – а – contig_1; б – contig_2; в – contig_3; г – contig_4

Рисунок 4.4.3 – Кластеры генов, идентифицированные в геноме *Pantoea vagans* B-14727 с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4

Таблица 4.4.5 – Результаты анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов *Pantoea vagans* B-14727

Регион	Тип	Расположение на геноме, п.н.	Длина кластера, п.н.	Уровень сходства	Похожий известный кластер	Сравнение с базой MiBIG	Оценка сходства	Организм
contig_1								
1	hserlactone	1236095–1256727	20,633	–	–	BGC0001928.2	0,46	–
2	redox-cofactor	1389233–1411398	22,166	–	–	BGC0001440.5	0,41	–
3	NRPS, phosphonate	1860921–1903830	42,910	–	–	BGC0001859.4	0,36	–
4	azole-containing-RiPP	2067374–2093638	26,265	–	–	BGC0001285.5	0,31	–
5	terpene-precursor	2463054–2483953	20,900	–	–	BGC0001361.3	0,50	–
6	Nl-siderophore	2842318–2872669	30,352	Высокий	desferrioxamine E	BGC0001572.3	0,85	<i>Pantoea agglomerans</i>
7	Nl-siderophore	3258174–3290546	32,373	Высокий	aerobactin	BGC0001499.5	0,90	<i>Pantoea ananatis</i>
contig_2								
1	Nl-siderophore	840312–872684	32,373	Высокий	aerobactin	BGC0001499.5	0,90	<i>Pantoea ananatis</i>

Продолжение таблицы 4.4.5

Регион	Тип	Расположение на геноме, п.н.	Длина кластера, п.н.	Уровень сходства	Похожий известный кластер	Сравнение с базой MiBIG	Оценка сходства	Организм
contig_3								
1	terpene	67528–93289	25,762	Высокий	carotenoid	BGC0000638.3	0,89	<i>Pantoea ananatis</i>
contig_4								
1	hglE-KS PUFA NRPS T1PKS	149575–62927	80,607	Высокий	Zeamine, zeamine I, zeamine II, Prezeamine, prezeamine I	BGC0001872.3	1,27	<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004

Сидерофоры аэробактин и десферриоксамин E играют ключевую роль в конкурентных взаимодействиях микроорганизмов за счёт своей способности к связыванию, хелатированию и последующему импорту ионов железа. Благодаря высокой связывающей способности к Fe^{3+} эти соединения позволяют некоторым бактериям эффективно захватывать железо из окружающей среды, создавая условия дефицита для других видов. Такой механизм является одним из универсальных способов микробного антагонизма, поскольку ограничение количества железа приводит к замедлению роста или полной остановке жизнедеятельности чувствительных микроорганизмов [146, 219].

В работе Choi et al. [179] показано, что мутантные штаммы *Pantoea ananatis*, утратившие способность синтезировать аэробактин и десферриоксамин E, полностью теряют как синтез сидерофоров, так и способность подавлять рост чувствительных микроорганизмов. Авторы продемонстрировали, что оба сидерофора необходимы для проявления антагонистической активности. Такой результат служит прямым доказательством того, что связывание железа является механизмом антимикробного действия штаммов рода *Pantoea*. Похожие выводы отражены и в других исследованиях рода *Pantoea*. Так, в геномном анализе *Pantoea vagans* показано, что десферриоксамин E является основным гидроксаматным сидерофором этого вида и что его наличие связано с конкурентоспособностью и потенциальной антагонистической активностью в растительных экосистемах [174].

Каротиноиды являются важным компонентом стратегии выживания и антагонизма микроорганизмов, поскольку они выполняют функцию мощных антиоксидантов [115], эффективно нейтрализуя реактивные формы кислорода и предотвращая перекисное окисление липидов мембран [192]. Благодаря способности стабилизировать клеточные мембраны, каротиноиды повышают устойчивость бактерий к воздействию ультрафиолетового излучения, низких температур и химических стрессоров, включая токсичные метаболиты и органические растворители [115, 116]. Поддержание целостности мембраны и защита от окислительного повреждения позволяет клеткам сохранять метаболическую активность даже в неблагоприятных условиях, что, в свою

очередь, обеспечивает возможность продолжать биосинтез антимикробных соединений, таких как сидерофоры и антибиотики. В совокупности это усиливает антагонистический потенциал микроорганизмов, делая их более конкурентоспособными в среде с ограниченными ресурсами [102].

Особенностью штамма *Pantoea vagans* B-14727 является наличие дополнительных генетических кластеров, связанных с биосинтезом зеамин, зеамин I, зеамин II, а также презеамин и презеамин I. Зеамин и презеамин представляют собой пептидные антибиотики с выраженной бактерицидной активностью [217]. Эти соединения способны напрямую повреждать клеточные структуры чувствительных микроорганизмов, включая клеточные мембраны и жизненно важные ферментные пути. В отличие от сидерофоров, обеспечивающих конкурентное вытеснение через ограничения количества железа, зеаминовая группа соединений оказывает прямое антибактериальное действие [217], что делает штамм *Pantoea vagans* B-14727 потенциальным антагонистом в отношении широкого спектра фитопатогенных и почвенных микроорганизмов.

Таким образом, совокупность синтезируемых веществ – сидерофоры (аэробактин и десферриоксамин E), каротиноид и пептидные антибиотики (зеамин и презеамин) – формирует комплексный механизм антимикробной активности. Он включает конкурентное вытеснение (за счёт ограничения количества железа), повышенную стрессоустойчивость (благодаря каротиноидам) и прямое бактерицидное действие (за счёт зеаминов и производных). Такое сочетание факторов делает штаммы рода *Pantoea* перспективными для биоконтроля и подавления фитопатогенной микроорганизмов.

4.5 Исследование цитотоксических свойств бактериальных штаммов

Для оценки потенциальной безопасности исследуемых штаммов исследовано их цитотоксическое воздействие на эукариотические клетки. Оценка проводилась

методом МТТ-теста с использованием клеточной линии НЕК293Т при воздействии различных концентраций бактериальных штаммов. Перед проведением дисперсионного анализа было установлено, что распределения получаемых значений МТТ-теста в каждом из повторов эксперимента являются нормальными, а дисперсии выборок равны. Нормальность распределения проверена графически при помощи QQ-plot и теста Шапира-Уилка. Равенство дисперсий оценено при помощи теста Левена.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) указывают, что на выживаемость клеток влияет как сам исследуемый образец, так и его доза. Можно отметить, что образец *Pantoea agglomerans* В-14726 отличался по своему влиянию на клетки от двух других (визуальные наблюдения за лунками). Ниже на рисунке 4.5.1 представлен общий график выживаемости клеток при различных концентрациях образцов. Каждый повтор эксперимента представлен отдельно.

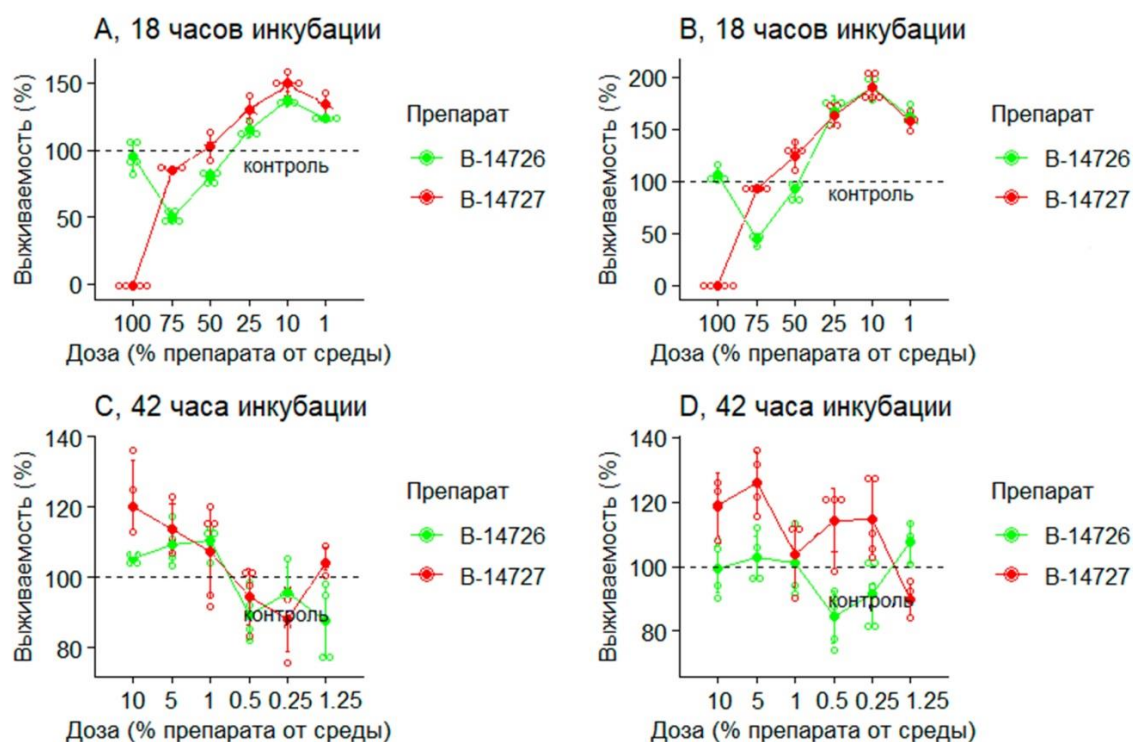


Рисунок 4.5.1 – Выживаемость клеток НЕК293Т при различных дозах образцов

В-14726, В-14727 в культуральной среде. А и В – первый и второй повтор эксперимента с высокими концентрациями образцов в среде (инкубация 18 ч), С и Д – первый и второй повтор эксперимента с низкими концентрациями образцов в среде (инкубация 42 ч). Пустые точки – экспериментальные значения, закрашенные точки – средние значения, интервалы – стандартное отклонение

Согласно полученным данным, все два исследуемых образца в малых дозах (в концентрации до 1 %) не оказывают влияния на рост клеток. При дальнейшем увеличении их концентрации до 25 % от объёма культуральной среды все два образца оказывают стимулирующее влияние на рост клеток, что позволяет предположить, что в образцах содержатся соединения, которые используются клетками как питательные вещества. При концентрации образцов 50 % в культуральной среде выживаемость клеток сравнима с выживаемостью клеток в контрольном образце. При дальнейшем увеличении концентрации образцов в среде выживаемость клеток снижается, но, по-видимому, не от токсичности образцов, а из-за сильного снижения концентрации необходимых для роста клеток веществ в самой культуральной среде.

Также следует отметить кажущееся повышение выживаемости клеток при полной замене клеточной среды на образец *Pantoea agglomerans* В-14726 (точка 100 %), что отличается от эффекта *Pantoea vagans* В-14727 в той же концентрации. Это скорее всего является артефактом, так как при проведении эксперимента хотя и было отмечено появление интенсивной фиолетовой окраски, однако визуально она отличалась от таковой, которая образуется вследствие нормального роста клеток. Исследование таких лунок под микроскопом показало крайне слабую жизнедеятельность клеток (изменение морфологии клеток, их отделение от подложки).

Таким образом, исследования, выполненные на клетках НЕК293Т по определению цитотоксичности образцов *Pantoea agglomerans* В-14726 и *Pantoea vagans* В-14727 с помощью МТТ-теста, показывают, что исследуемые препараты не являются цитотоксичными. Данные, полученные в ходе исследования, подтверждают перспективность использования указанных штаммов рода *Pantoea* для разработки биопрепаратов в области сельского хозяйства.

4.6 Заключение по главе 4

В рамках данной главы были проведены исследования по конструированию бактериальных консорциумов на основе ранее выделенных перспективных штаммов ризобактерий: *Bacillus thuringiensis* B-14700, *Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726, *Pantoea vagans* B-14727.

На начальном этапе была изучена совместимость штаммов с целью исключения антагонистических взаимодействий. Выявлено ингибирующее воздействие *Bacillus thuringiensis* B-14700 на остальные штаммы, что учтено при формировании консорциумов. Далее был проведен скрининг ростостимулирующих свойств и антагонистической активности сконструированных консорциумов. Результаты показали значительную вариабельность ростостимулирующей активности консорциумов, при этом в ряде случаев наблюдался синергический эффект.

Анализ ростостимулирующих свойств выявил синергетический эффект для большинства консорциумов (за исключением № 1, № 5 и № 8), проявляющийся в повышении характеристик по сравнению со средними значениями отдельных штаммов. В частности, консорциумы (кроме № 1, № 5 и № 8) проявили антиоксидантную активность в диапазоне 80,2–85,8 %. Консорциумы № 2–5, № 9 и № 10 характеризовались повышенным синтезом индолил-3-уксусной кислоты (более 9 мг/мл). Большинство консорциумов (за исключением № 1 и № 8) показали увеличение продукции гиббереллиновой кислоты в 2–3 раза по сравнению с отдельными штаммами, при этом консорциумы № 3–7, № 9 и № 10 демонстрировали концентрацию гиббереллиновой кислоты выше 500 мкг/мл. Консорциумы № 2–4, № 6, № 9 и № 10 проявили способность к фиксации азота на уровне более 600 мкг/мл. Большинство консорциумов (№ 2–6, № 8–10) проявили более высокую антагонистическую активность по отношению к *Fusarium graminearum* F-877, диаметр зоны ингибирования составил 6,75–8,35 см.

Консорциумы № 7 и № 9 показали высокую активность против *Bipolaris sorokiniana* F-529 (диаметр зоны ингибирования более 5 см), а консорциумы № 2–4, № 6, № 8–10 – против *Botrytis cinerea* F-1006 (диаметр зоны ингибирования 5,90–8,50 см).

В результате скрининга выделены наиболее перспективные консорциумы № 4 (общий ранг 3,60) (*Bacillus subtilis* B-14701, *Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726), № 9 (общий ранг 3,55) (*Pantoea agglomerans* B-14726 и *Pantoea vagans* B-14727) и № 10 (3,50) (*Raoultella ornithinolytica* B-14725, *Pantoea agglomerans* B-14726, *Pantoea vagans* B-14727), продемонстрировавшие высокий уровень ростостимулирующей и антагонистической активности.

Отобранные консорциумы были использованы для оценки влияния на рост и развитие яровой мягкой пшеницы сорта Сибирский Альянс в лабораторных условиях при искусственно созданном биотическом стрессе (заражение *F. graminearum* F-877, *B. sorokiniana* F-529, *B. cinerea* F-1006). Всхожесть семян варьировалась от 63 до 92 %, длина ростка – от 109 до 160 мм, корня – от 63 до 103 мм, содержание хлорофилла а – от 1,19 до 1,83 мг/г, хлорофилла b – от 0,49 до 0,96 мг/г, каротиноидов – от 0,98 до 1,71 мг/г. Отмечено негативное влияние фитопатогенов на показатели роста, однако обработка семян как отдельными штаммами, так и консорциумами в целом оказывала положительное влияние на развитие пшеницы по сравнению с контролем, при этом консорциумы демонстрировали наилучшие результаты. В частности, консорциум № 9 показал наиболее высокие результаты по всем исследуемым параметрам, превосходя отдельные штаммы по всхожести семян на 6–14 %, а по длине корня – до 10 мм. Кроме того, консорциум № 9 значительно повышает содержание фотосинтетических пигментов: хлорофилла а (1,83 мг/г), хлорофилла b (0,96 мг/г) и каротиноидов (1,71 мг/г). Применение консорциума № 9 привело к увеличению содержания хлорофилла а на 23,6 %, хлорофилла b на 41,2 % и каротиноидов на 55,5 % по сравнению с контролем.

Таким образом, в условиях биотического стресса консорциум № 9 (*P. agglomerans* В-14726 и *P. vagans* В-14727) оказался наиболее эффективным, обеспечивая улучшение ростовых показателей и содержания фотосинтезирующих пигментов пшеницы, что послужило основанием для его выбора в качестве основы разрабатываемого биопрепарата.

Биоинформатический анализ продемонстрировал, что у всех исследуемых штаммов выявлены генные кластеры, ответственные за синтез азробактина, десферриоксиамины Е и каротиноида. У штамма *Pantoea vagans* В-14727 дополнительно присутствовали генетические кластеры, связанные с биосинтезом зеамины, зеамины I, зеамины II, а также презеамины и презеамины I. Наличие этих кластеров генов делает штаммы рода *Pantoea* перспективными агентами биоконтроля в контексте органического сельского хозяйства. Кроме того, МТТ-тест, выполненный на клетках НЕК293Т, показал отсутствие цитотоксичности образцов *Pantoea agglomerans* В-14726 и *Pantoea vagans* В-14727.

ГЛАВА 5 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе представлены результаты исследований по оптимизации биотехнологических параметров культивирования биопрепарата «БП-010». Проведена оценка экономической целесообразности производства биопрепарата.

5.1 Подбор условий культивирования биопрепарата «БП-010» на основе бактериального консорциума ризобактерий

Для получения биопрепарата «БП-010» на основе консорциума ризобактерий № 9 (*P. agglomerans* В-14726 и *P. vagans* В-14727) подбирали состав питательной среды и температуру культивирования. Для первого этапа к 30 мл питательной среды определенного состава (таблица 5.1.1) добавляли 1,5 мл суспензии консорциума. Далее культивировали с использованием 8-ми позиционного биореактора RTS-8 («Biosan», Латвия) в течение 18 ч при температуре 28 ± 2 °С.

Таблица 5.1.1 – Составы питательных сред для культивирования биопрепарата

Компоненты	Вариант питательной среды							
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8
Бульон Лурия-Бертани, г/л	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Глюкоза, г/л	—	—	6,0	—	6,0	—	6,0	6,0
Калий фосфорнокислый 2-замещенный, г/л	—	—	—	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Магний сернокислый, г/л	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Аммоний сернокислый, г/л	—	—	—	1,5	1,5	—	—	1,5
Натрий хлористый, г/л	—	—	—	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
L-триптофан, г/л	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Мочевина, г/л	—	—	—	—	—	2,0	2,0	2,0

Кривые роста биопрепарата «БП-010» на основе консорциума № 9 в зависимости от состава питательной среды представлены на рисунке 5.1.1.

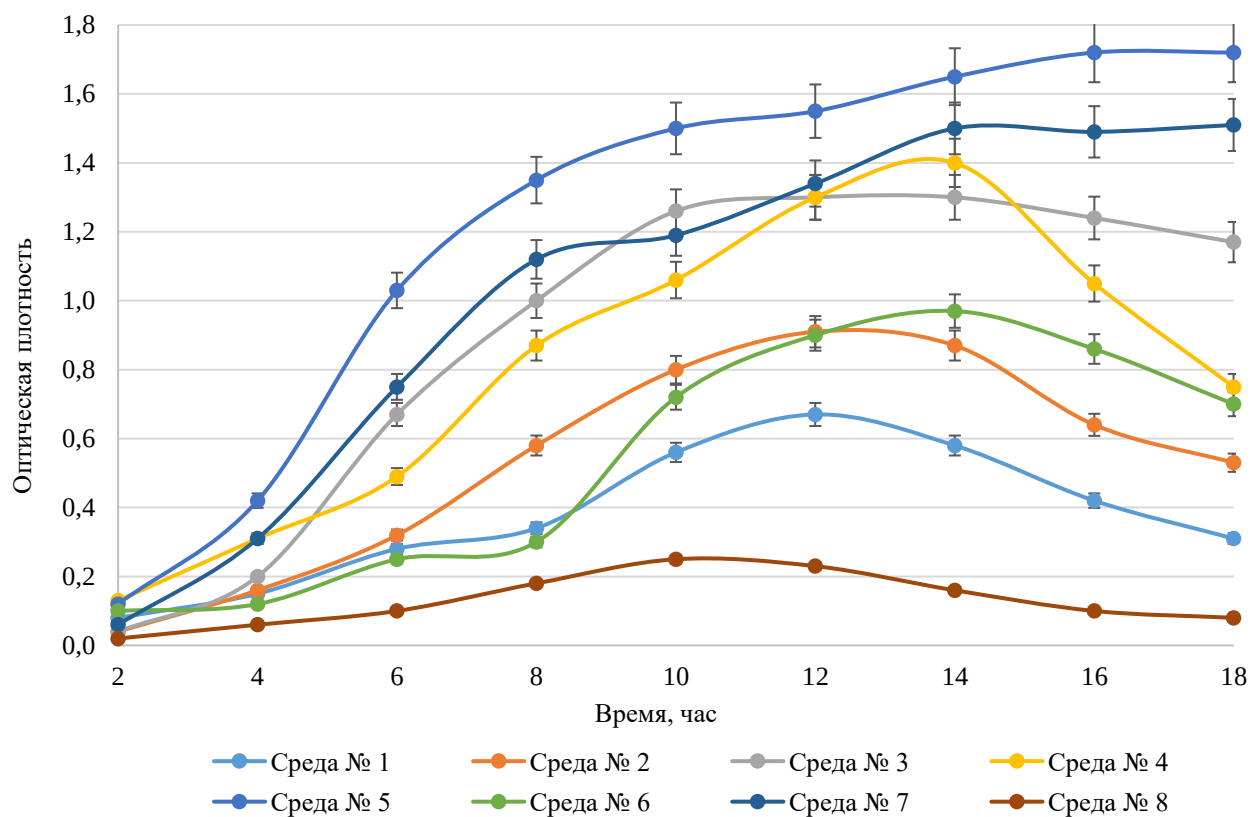


Рисунок 5.1.1 – Кривые роста биопрепарата «БП-010» в зависимости от состава питательной среды с планкой погрешности процент

Как видно из рисунка 5.1.1, на среде № 1 экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,31), стационарная фаза – 10 ч (оптическая плотность – 0,56), на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,31. На среде № 2 начало экспоненциальной фазы наблюдали через 6 ч культивирования (оптическая плотность – 0,32), стационарная фаза – 10 ч (оптическая плотность – 0,80) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,53. На среде № 3 экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,20), стационарная фаза – 10 ч (оптическая плотность – 1,26) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 1,17. На среде № 4 начало экспоненциальной фазы наблюдали через 6 ч культивирования (оптическая плотность – 0,46), стационарная фаза – 12 ч (оптическая

плотность – 1,34) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,75. На среде № 5 экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,42), стационарная фаза – 12 ч (оптическая плотность – 1,55) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 1,72. На среде № 6 начало экспоненциальной фазы наблюдали через 8 ч культивирования (оптическая плотность – 0,30), стационарная фаза – 12 ч (оптическая плотность – 0,90) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,70. На среде № 7 экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,31), стационарная фаза – 14 ч (оптическая плотность – 1,50) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 1,51. На среде № 8 начало экспоненциальной фазы наблюдали через 6 ч культивирования (оптическая плотность – 0,10), стационарная фаза – 10 ч (оптическая плотность – 0,25) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,08.

Таким образом, оптимальный состав питательной среды для получения биопрепарата «БП-010» на основе штаммов *P. agglomerans* В-14726 и *P. vagans* В-14727, г/л: бульон Лурия-Бертани в модификации Миллера – 25,0; глюкоза – 6; калий фосфорнокислый 2-замещенный – 7; магний сернокислый – 0,1; аммоний сернокислый – 1,5; натрий хлористый – 4; L-триптофан – 0,5.

Для подбора оптимальной температуры культивирования биопрепарата к 30 мл питательной среды оптимального состава, представленного выше, добавляли 1,5 мл суспензии консорциума. Культивировали в течение 18 ч при температуре 25, 28, 32, 35 и 40 °С.

Кривые роста биопрепарата «БП-010» в зависимости от температуры представлены на рисунке 5.1.2. При температуре 25 °С на среде с оптимальным составом питательных веществ экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,31), стационарная фаза – 12 ч (оптическая плотность – 1,17), на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,87. При температуре 28 °С начало экспоненциальной фазы наблюдали через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,43), стационарная фаза – 14 ч (оптическая плотность – 1,66) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 1,75.

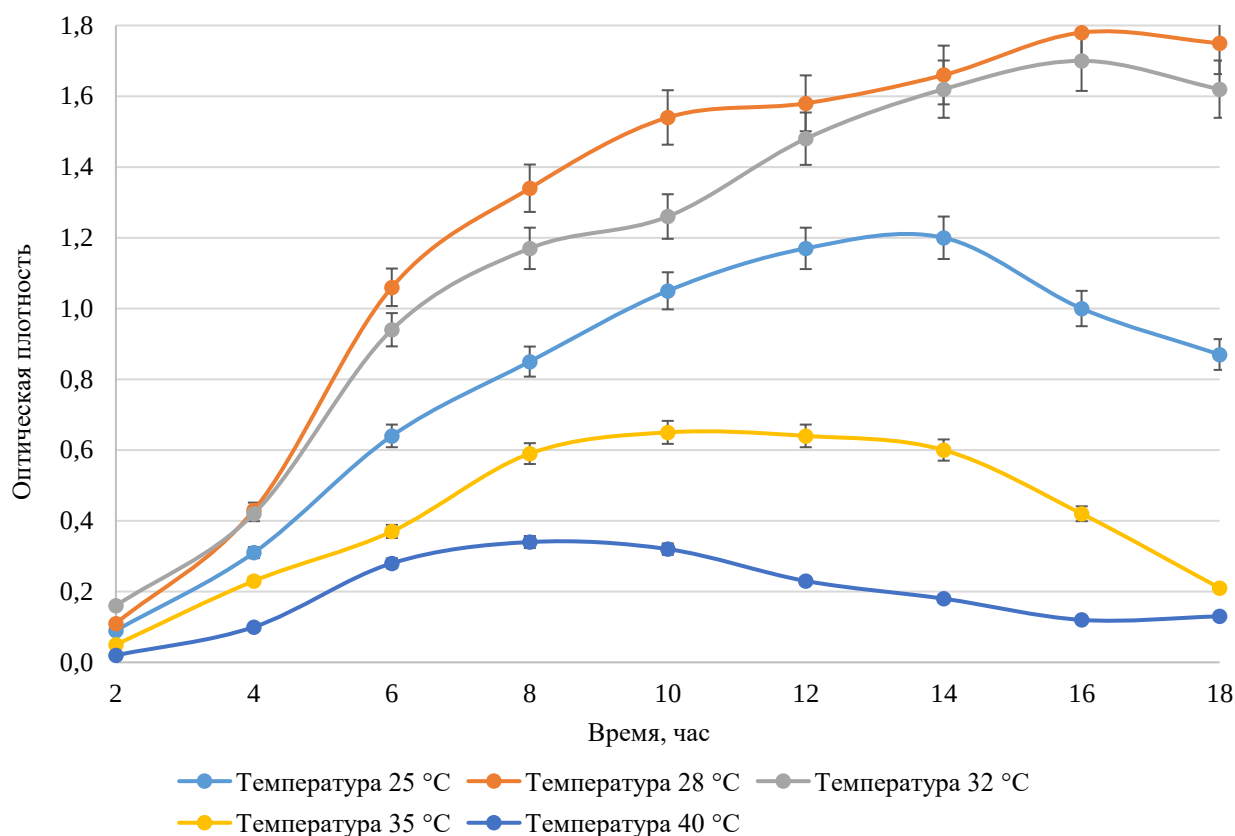


Рисунок 5.1.2 – Кривые роста биопрепарата «БП-010» в зависимости от температуры с планкой погрешности процент

При температуре 32 °C на среде с оптимальным составом питательных веществ экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,42), стационарная фаза – 14 ч (оптическая плотность – 1,62), на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 1,62. При температуре 35 °C начало экспоненциальной фазы наблюдали через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,23), стационарная фаза – 8 ч (оптическая плотность – 0,59) на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,21. При температуре 40 °C на среде с оптимальным составом питательных веществ экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,10), стационарная фаза – 6 ч (оптическая плотность – 0,28), на 18 ч культивирования оптическая плотность составляла 0,13. Таким образом, оптимальная температура культивирования составила 28 °C.

Определение показателей качества и безопасности разработанного биопрепарата «БП-010». Количество жизнеспособных клеток определяли в соответствии с ГОСТ ISO 6887-1-2015. Определение количества тяжелых металлов (свинец, кадмий, ртуть и мышьяк) проводили в соответствии с ГОСТ Р 53117-2008. Определение содержания патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (энтеробактерий, энтерококков, стафилококков, клостридий) осуществляли в соответствии с ГОСТ 33379-2015.

Показатели качества и безопасности разработанного биопрепарата «БП-010» представлены в таблице 5.1.2.

Таблица 5.1.2 – Результаты определения показателей качества и безопасности биопрепарата «БП-010»

Показатель	Норма	Значение
Количество жизнеспособных клеток, не менее	5×10^{11} КОЕ/см ³	8×10^{12} КОЕ/см ³
Массовая концентрация примесей отдельных токсичных элементов (валовое содержание), мг/кг сухого вещества, не более: – свинца – кадмия – ртути – мышьяка	130,0 2,0 2,1 10,0	Не обнаружено на уровне определения методики
Наличие патогенных и болезнетворных микроорганизмов, в том числе энтеробактерий (патогенных серовариантов кишечной палочки, сальмонелл, протеи), энтерококков, стафилококков, клостридий, КОЕ/г	Не допускается	н/о

Примечание: н/о – не обнаружено.

Разработанный биопрепарат характеризуется высокой концентрацией жизнеспособных клеток – 8×10^{12} КОЕ/см³. По результатам исследования качества биопрепарата «БП-010» не выявлено присутствие примесей токсичных элементов

(свинца, кадмия, ртути, мышьяка); не обнаружены патогенные и болезнетворные микроорганизмы, в том числе энтеробактерии (патогенные сероварианты кишечной палочки, сальмонеллы, протеи), энтерококки, стафилококки, клостридии. Срок годности препарата составляет 6 месяцев при температуре 4 ± 2 °С.

5.2 Экономическая оценка производства разработанного биопрепарата «БП-010»

Оценка экономической эффективности разработанного биопрепарата «БП-010» на основе ризосферных бактерий является заключительным этапом исследований, направленных на обоснование целесообразности его внедрения в с/х производство. Данный раздел посвящен анализу затрат на производство, определению себестоимости и цены, а также сравнительной оценке с аналогами биологического и химического происхождения.

Ключевыми потребителями разработанного биопрепарата «БП-010» являются:

- крупные сельскохозяйственные организации: данный сегмент заинтересован в оптимизации производственных процессов, повышении урожайности и снижении химической нагрузки на почву, что делает биопрепарат «БП-010» привлекательной альтернативой традиционным химическим средствам защиты растений.

- крестьянские (фермерские) хозяйства и индивидуальные предприниматели ориентированы на стабилизацию почвенного плодородия, продуктивности полевых культур и получение экологически чистой продукции, что соответствует механизму действия биопрепарата «БП-010».

- хозяйства населения: данный сегмент характеризуется стремлением к безопасному и эффективному выращиванию сельскохозяйственных культур для личного потребления, где экологичность препарата является приоритетным фактором.

Рыночный потенциал биопрепарата «БП-010» определяется растущим спросом на экологически чистую продукцию и ужесточением требований к использованию химических средств защиты растений.

Для анализа себестоимости производства биопрепарата «БП-010» был проведен расчет затрат на сырье, материалы, энергию и другие ресурсы. В таблице 5.2.1 представлены данные о затратах на сырье и материалы для производства 10 л биопрепарата «БП-010».

Таблица 5.2.1 – Затраты на сырье и материалы для производства биопрепарата

Сырье и материалы	Расход сырья на 1 л	Расход сырья на 10 л	Оптовая цена, руб.	Стоимость, руб.
Бульон Лурия-Бертани, г	25,0	250,0	10,00	2500,00
Глюкоза, г	6,0	60,0	0,09	5,40
Калий фосфорнокислый 2-замещенный, г	7,0	70,0	0,28	19,60
Магний сернокислый, г	0,1	1,0	0,07	0,07
Аммоний сернокислый, г	1,5	15,0	0,08	1,20
Натрий хлористый, г	4,0	40,0	0,02	0,80
L-триптофан, г	0,5	5,0	5,00	25,00
Канистра HDPE 10 л, шт.	—	1	100,00	100,00
ИТОГО:				2652,07

Данные таблицы 5.2.1 демонстрируют, что наибольшую долю в стоимости сырья занимают затраты на бульон Лурия-Бертани и составляют 94,3 % от общих затрат на сырье и материалы.

Структура себестоимости биопрепарата «БП-010» представлена в таблице 5.2.2.

Результаты расчета показывают, что полная себестоимость производства 10 л биопрепарата «БП-010» составляет 3417,63 руб. С учетом рентабельности в 20 %, оптовая цена составляет 4101,16 руб.

Для определения конкурентоспособности биопрепарата «БП-010» был проведен сравнительный анализ с существующими на рынке аналогами. Результаты анализа представлены в таблице 5.2.3.

Таблица 5.2.2 – Структура себестоимости производства и цены биопрепарата «БП-010»

Статьи затрат	Удельный вес, %	Себестоимость, руб.
Материальные затраты, в том числе:	87,6	2993,84
сырье	77,6	2652,07
транспортные расходы	2,2	75,19
топливно-энергетические расходы	4,3	146,96
упаковка	3,5	119,62
Затраты с отчислениями	1,7	58,10
Амортизация	1,8	61,52
Условно-постоянные расходы	8,9	304,17
Полная себестоимость	100,0	3417,63
Рентабельность	20 % от полной себестоимости	
Прибыль	—	683,53
Оптовая цена	—	4101,16

Таблица 5.2.3 – Сравнительный анализ конкурентов

Конкурентный фактор	Биопрепарат «БП-010»	БАКТОФИТ	СИСТИВА	ИНШУР
Характеристика		бактериальный фунгицид от грибных и бактериальных болезней	химические фунгицидные протравители	
Производитель		ООО «Сиббиофарм»	ООО «БАСФ»	
Стоимость 1 л, руб.	410,12	180,00	16940,00	5170,00
Расход на 1 га, л	2,5	4,5	0,127	0,125
Стоимость обработки 1 га, руб.	1 025,30	810,00	2 151,38	646,25
			2 797,63	
Титр, КОЕ/мл	8×10^{12}	Не менее 2×10^9	—	—
Действующая основа	клетки штаммов <i>P. agglomerans</i> В-14726, <i>P. vagans</i> В-14727	споры и клетки культуры штамма ИПМ-215 <i>Bacillus subtilis</i> , метаболиты	333 г/л флуксапироксад	80 г/л тритиконазол, 40 г/л пиракlostробин

Несмотря на высокую концентрацию действующего вещества (титр клеток ризобактерий составляет 8×10^{12} КОЕ/мл), стоимость обработки 1 га биопрепаратом «БП-010» (1025,30 руб.) является конкурентоспособной. Она выше, чем у «Бактофита» (810,00 руб.), но значительно ниже общей стоимости обработки химическими фунгицидами «Систива» и «Иншур» (2797,63 руб.). Это делает биопрепарат «БП-010» экономически более привлекательным вариантом.

Важным преимуществом разработанного биопрепарата «БП-010» является оптимизированный микробиологический состав, основанный на клетках штаммов ризобактерий пшеницы *R. agglomerans* В-14726 и *R. vagans* В-14727. Это обеспечивает экологическую безопасность применения и снижает риск негативного воздействия на окружающую среду, в отличие от химических фунгицидов, содержащих синтетические действующие вещества. Биопрепарат «БП-010» имеет хороший потенциал для широкого внедрения в сельскохозяйственное производство как эффективная и экологически безопасная альтернатива химическим фунгицидам.

Для биопрепарата «БП-010» разработаны и утверждены технические условия и технологическая инструкция по производству (ТУ 20.20.19-294-02068309-2024 и ТИ 20.20.19-294-02068309-2024) (Приложение Г).

5.4 Заключение по главе 5

В рамках исследований, представленных в главе 5, была проведена оптимизация условий культивирования консорциума ризобактерий № 9, что позволило разработать биопрепарат «БП-010». В результате подбора оптимального состава питательной среды (среда № 5, содержащая 25 г/л бульона Лурия-Бертани, 6 г/л глюкозы, 7 г/л калия фосфорнокислого 2-зам., 0,1 г/л магния сернокислого, 1,5 г/л аммония сернокислого, 4 г/л натрия хлористого и 0,5 г/л L-триптофана) и температурного режима (28 °С) удалось достичь высокой

скорости роста биомассы: экспоненциальная фаза начиналась через 4 часа культивирования (оптическая плотность – 0,43), стационарная фаза – через 14 часов (оптическая плотность – 1,66), максимальная оптическая плотность через 18 часов культивирования составила 1,75.

Проведенная экономическая оценка показала, что себестоимость производства 10-литровой канистры «БП-010» составляет 4101,16 руб., а стоимость обработки 1 га – 1025,30 руб. Несмотря на то, что это несколько выше, чем стоимость обработки биологическим препаратом «Бактофит» (810,00 руб./га), разработанный биопрепарат «БП-010» существенно экономичнее обработки химическими фунгицидами (2797,63 руб./га), что делает его экономически выгодным для сельхозпроизводителей.

Полученные результаты позволяют рекомендовать биопрепарат «БП-010» для внедрения в сельскохозяйственное производство в качестве экологически безопасного средства повышения урожайности и улучшения качества продукции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Отобрано 42 штамма ризобактерий из ризосферы зерновых культур. Штаммы характеризуются устойчивостью к стрессовым факторам, таким как агрохимикаты, высокая степень засоления и ограниченное содержание питательных веществ, что делает их перспективными кандидатами для разработки универсальных биопрепаратов.

2. Изучены биотехнологически ценные свойства ризобактерий, включая продукцию фитогормонов, фиксирование атмосферного азота, солюбилизацию фосфатов, и антагонистическую активность в отношении фитопатогенов (*Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006).

3. Установлена видовая и родовая принадлежность отобранных штаммов ризобактерий: № 26 – *Bacillus thuringiensis* B-14700, № 29 – *Bacillus subtilis* B-14701, № 31 – *Raoultella ornithinolytica* B-14725, № 35 – *Pantoea agglomerans* B-14726, № 36 – *Pantoea vagans* B-14727.

4. Сконструированы 10 бактериальных консорциумов на основе отобранных ризобактерий. Определены перспективные составы, характеризующиеся высокой ростостимулирующими и антагонистическими свойствами: № 4 (общий ранг 3,60), № 9 (3,55), № 10 (3,50). На основе оценки влияния на рост и развитие модельной культуры (яровой мягкой пшеницы) в лабораторных условиях, отобран консорциум № 9 (*Pantoea vagans* B-14727, *Pantoea agglomerans* B-14726 в соотношении 1:1) для разработки биопрепарата «БП-010». В геноме ризобактерий, входящих в состав биопрепарата, выявлены кластеры генов, отвечающие за синтез сидерофоров, терпенов и антибиотиков. Выявлено отсутствие цитотоксического эффекта штаммов на нераковой клеточной линии НЕК293Т.

5. Оптимизированы условия культивирования биопрепарата «БП-010». Определен оптимальный состав питательной среды, г/л: бульон Лурия-Бертани в модификации Миллера – 25,0; глюкоза – 6; калий фосфорнокислый 2-зам. – 7; магний сернокислый – 0,1; аммоний сернокислый – 1,5; натрий хлористый – 4; L-триптофан – 0,5; оптимальная температура культивирования – 28 °С.

6. Проведена экономическая оценка производства разработанного биопрепарата «БП-010». Расчетная стоимость составила 4101,16 руб./10 л. Срок годности препарата составляет 6 месяцев при температуре 4 ± 2 °С. Разработана техническая документация.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агротехнологические основы создания усовершенствованных форм микробных биопрепаратов для земледелия / А.П. Кожемяков, Ю.В. Лактионов, Т.А. Попова, А.Г. Орлова и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т.50. – № 3. – С. 360–376.
2. Анализ возможных механизмов взаимодействия микроорганизмов с минералами горных пород / Н.А. Донияров, А.А. Асроров, Н.И. Мурудов, И.Н. Хуррамов и др. // Journal of Advances in Engineering Technology. – 2020. – № 2. – С. 59–66.
3. Антагонистическое действие молочнокислых бактерий и их консорциума с дрожжами на патогенные микроорганизмы / В.С. Ржевская, Е.Ф. Семенова, Г.П. Зайцев, Е.А. Сластья и др. // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – № 5. – С. 96–107.
4. Артамонова, В.С. Об экосистемных функциях гумусогенного слоя технозёмов в отдалённый период землевания отвалов угледобычи в Сибири / В.С. Артамонова, С.Б. Бортникова, В.А. Андроханов // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2024. – № 1. – С. 92–106.
5. Белимов, А.А. Повышение урожайности яровой мягкой пшеницы и снижение вредоносности возбудителей болезней с помощью ассоциативных ризобактерий / А.А. Белимов, Л.Е. Колесников, П.М. Донес // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2018. – № 52. – С. 26–33.
6. Белимов, А.А. Смешанные культуры азотфиксирующих бактерий и перспективы их использования в земледелии / А.А. Белимов, А.П. Кожемяков // Сельскохозяйственная биология. – 1992. – Т. 27. – № 5. – С. 77–87.
7. Белкин, Д.Д. Бактериальные и дрожжевые сообщества виноградной лозы сортов Молдова и Мерло / Д.Д. Белкин, Е.Г. Юрченко, Д.В. Карпова // Научные труды СКФНЦСВВ. – 2021. – Т. 33. – С. 69–73.

8. Биологический потенциал нового бактериального штамма рода *Pantoea* в защите от биотического стресса и стимуляции роста зерновых культур / Е.Е. Бородина, А.В. Гордиенко, И.И. Плешивцев, Н.В. Фотина и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2025. – Т. 4. – № 55. – С. 710–722.
9. Битюцкий, Н.П. Микроэлементы высших растений / Н.П. Битюцкий. – 2-е изд. – Санкт-Петербург: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2020. – 368 с.
10. Бородина, Е.Е. Экстремофильные микроорганизмы Кемеровской области-Кузбасса как агенты для повышения доступности азота в почвах / Е.Е. Бородина, Н.В. Фотина, Л.К. Асякина // Материалы XII Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии». – Кемерово, 2024. – С. 286–287.
11. Влияние кратности обработок картофеля эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* на содержание пигментов в листьях, продуктивность и устойчивость к болезням / Л.И. Пусенкова, С.Р. Гарипова, К.А. Федорова, М.А. Дедова // Достижения науки и техники АПК. – 2022. – Т. 36. – № 10. – С. 11–17.
12. Влияние эндогенных цитокининов на проявление защитного действия метилжасмоната на растения пшеницы / М.В. Безрукова, А.Р. Лубянова, Д.Р. Масленникова и др. // Экобиотех. – 2019. – Т. 2. – № 4. – С. 553–558.
13. Волобуева, О.Г. Влияние Корневина и Ризоторфина на гормональный статус и эффективность симбиотической системы растений фасоли / О.Г. Волобуева // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2020. – № 2(34). – С. 29–34.
14. Галиева, Г.Ш. Растительный микробиом: происхождение, состав и функции / Г.Ш. Галиева, П.Ю. Галицкая, С.Ю. Селивановская // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2023. – Т. 165(2). – С. 231–262.
15. Градчанинова, О.Д. Методические указания по изучению мировой коллекции пшеницы / О.Д. Градчанинова, А.А. Филатенко, М.И. Руденко. – Л.: ВИР, 1987. – 16 с.

16. Ерегина, С.В. Потенциал использования микроорганизмов рода *Bacillus* в растениеводстве / С.В. Ерегина, М.М. Кузнецова // Известия СПбГАУ. – 2024. – № 3. – 19–35.
17. Жиганова, Л.П. Современные перспективы, оценка пользы и рисков применения генетически модифицированных растений в США и в мире / Л.П. Жиганова // Московский экономический журнал. – 2024. – Т. 9(11). – С. 10–35.
18. Завалин, А.А. Ассоциативная азотфиксация и практика применения биопрепаратов в посевах сельскохозяйственных культур / А.А. Завалин, А.А. Алферов, Л.С. Чернова // Агрохимия. – 2019. – № 8. – С. 83–96.
19. Завалин, А.А. Влияние препаратов азотфиксирующих микроорганизмов на питание и продуктивность яровой пшеницы / А.А. Завалин, Т.М. Кандаурова, Л.С. Чернова // Агрохимия. – 1997. – № 3. – С. 33–40.
20. Завалин, А.А. Эффективность применения биопрепаратов в посеве озимой пшеницы на светло-серой лесной почве / А.А. Завалин, А.М. Накаряков // Земледелие. – 2021. – № 1. – С. 27–30.
21. Зарипова, А.А. Динамика содержания фитогормонов в почках возобновления пиона уклоняющегося при их введении в культуру *in vitro* / А.А. Зарипова // Агрохимия. – 2019. – № 9. – С. 60–66.
22. Иванищев, В.В. Проблемы проникновения железа в растения / В.В. Иванищев // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2019. – № 3. – С. 139–148.
23. Иванищев, В.В. Роль железа в биохимии растений / В.В. Иванищев // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2019. – № 3. – С. 149–159.
24. Использование биопрепаратов – дополнительный источник элементов питания растений / И.А. Тихонович, А.А. Завалин, Г.Г. Благовещенская, А.П. Кожемяков // Плодородие. – 2011. – № 3 (60). – С. 9–13.
25. Исследование потенциала естественной микробиоты яровой мягкой пшеницы в повышении урожайности / Л.К. Асякина, G. Mudgal,

С.Л. Тихонов, Н.В. Фотина и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2023. – Т. 37. – № 11. – С. 12–17.

26. Исследование фитостимулирующей активности бактерий рода *Pseudomonas* / Н.В. Фотина, Л.К. Асякина, Ю.В. Голубцова, К.В. Карчин // Материалы XI Инновационного конвента «Кузбасс: образование, наука, инновации». – Кемерово, 2023. – С. 212–213.

27. Каншанов, Н.З. Белково-энергетический обмен и нутритивная поддержка у пациентов на экстракорпоральной мембранной оксигенации: систематический обзор / Н.З. Каншанов, И.Н. Лейдерман, А.О. Маричев // Вестник интенсивной терапии имени А.И. Салтанова. – 2023. – № 1. – С. 56–70.

28. Киселев, А.С. Оценка действия биопрепаратов на урожайность и содержание белка в зерне гороха посевного (*Pisum sativum* L.) в южной лесостепи Западной Сибири / А.С. Киселев, Н.А. Поползухина, П.В. Поползухин // Проблемы агрохимии и экологии. – 2019. – № 4. – С. 50–54.

29. Ключевой стимулятор роста растений – ризобактерии / Т.З. Ха, А.В. Канарский, З.А. Канарская, А.В. Щербаков и др. // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2020. – № 3(47). – С. 58–73.

30. Кожемяков, А.П. Использование инокулянтов бобовых и биопрепаратов комплексного действия в сельском хозяйстве / А.П. Кожемяков, И.А. Тихонович // Доклады РАСХН. – 1998. – № 6. – С. 7–10.

31. Кожемяков, А.П. Эффективность и основные свойства симбиотических и ассоциативных бактерий – инокулятов симбиотических культур / А.П. Кожемяков // Сельскохозяйственная микробиология в XIX–XXI вв. – Санкт-Петербург, 2001. – С. 25–26.

32. Козакова, В.Н. Перспективные регуляторы роста растений / В.Н. Козакова, Ю.А. Вятсияр, Э.Г. Полуэктова // Химия в сельском хозяйстве. – 1986. – № 8. – С. 49–50.

33. Козловская, В.Ф. Бактерии, способствующие росту растений – путь к стабильному, экологически безопасному растениеводству / В.Ф. Козловская // Сахарная свекла. – 2019. – № 9. – С. 33–43.
34. Концентрация кальция и железа в растениях пшеницы при формировании поясков Каспари под влиянием засоления и ростстимулирующих бактерий / А.А. Белимов, Е.В. Мартыненко, Т.Н. Архипова, И.Р. Галин // Экобиотех. – 2025. – Т. 8. – № 1. – С. 91–100.
35. Кравченко, Л.В. Ризосфера область взаимодействия микроорганизмов и растений / Л.В.Кравченко // Сельскохозяйственная микробиология в XIX-XXI вв. – Санкт-Петербург, 2001. – 59 с.
36. Кузнецова, Д.А. Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций / Д.А. Кузнецова, В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 3. – С. 14–22.
37. Кулаева, О.Н. Достижения и перспективы в исследовании фитогормонов / О.Н. Кулаева, М.З. Чайлахян // Агрохимия. – 1984. – № 1. – С. 106–128.
38. Кулаева, О.Н. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов / О.Н. Кулаева, О.С. Прокопцева // Биохимия. – 2004. – Т. 69. – № 3. – С. 293–310.
39. Лагошина, А.Г. Влияние регуляторов роста растений на функциональные процессы сельскохозяйственных культур (литературный обзор) / А.Г. Лагошина, Э.К. Пчихачев, О.Г. Белоус // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2020. – № 74. – С. 120–131.
40. Ласточкина, О.В. Адаптация и устойчивость растений пшеницы к засухе, опосредованная природными регуляторами роста *Bacillus* spp.: механизмы реализации и практическая значимость (обзор) / О.В. Ласточкина // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – № 5. – С. 843–867.
41. Ласточкина, О.В. Механизмы ростстимулирующего и защитного действия эндофитных PGP-бактерий в растениях пшеницы при воздействии засухи (обзор) /

О.В. Ласточкина, Ч.Р. Аллагулова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59(1). – С. 17–37.

42. Лубянова, А.Р. Взаимодействие сигнальных путей при формировании защитных реакций растений в ответ на стрессовые факторы окружающей среды / А.Р. Лубянова, М.В. Безрукова, Ф.М. Шакирова // Физиология растений. – 2021. – Т. 68(6). – С. 563–578.

43. Лубянова, А.Р. Влияние 24-эпибрассинолида на локализацию АБК, АЗП и дегидринов в корнях растений пшеницы при обезвоживании / А.Р. Лубянова, Ф.М. Шакирова, М.В. Безрукова // Биомика. – 2020. – Т. 12. – № 3. – С. 329–336.

44. Лукина, К.А. Голозерный ячмень: систематика, селекция и перспективы использования / К.А. Лукина, О.Н. Ковалева, И.Г. Лоскутов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26(6). – С. 524–536.

45. Максимов, И.В. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов (обзор) / И.В. Максимов, Р.Р. Абизгильдина, Л.И. Пусенкова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – С. 373–385.

46. Микробная биофортификация злаковых культур: перспективы и текущее развитие / Д.Е. Колпакова, Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина, А.В. Заушинцева и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2024. – Т. 54. – № 2. – С. 191–211.

47. Микробные сидерофоры: строение, свойства и функции / В.В. Леонов, А.Ю. Миронов, И.В. Ананьина, Е.Е. Рубальская и др. // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – № 4. – С. 24–37.

48. О внесении изменений в постановление Коллегии Администрации Кемеровской области от 25.10.2013 № 464 «Об утверждении государственной программы Кемеровской области – Кузбасса «Государственная поддержка агропромышленного комплекса и устойчивого развития сельских территорий Кузбасса» на 2014 – 2024 годы» [Электронный ресурс]. – URL: <https://bulleten-kuzbass.ru/bulletin/297018%20/> (дата обращения: 11.05.2023).

49. Об утверждении Стратегии развития сельского хозяйства, пищевой и перерабатывающей промышленности Кемеровской области на период до 2035 года [Электронный ресурс]. – URL: <https://bulleten-kuzbass.ru/bulletin/220691> (дата обращения: 11.05.2023).

50. Образование индолилуксусной кислоты энтеробактериями, патогенными для человека / А.Л. Турская, Л.А. Беловежец, Т.Е. Путилина, В.А. Быбин и др. // Биохимия. – 2019. – Т. 4. – № 5. – С. 14–18.

51. Особенности взаимодействия растений и азотфиксирующих микроорганизмов / С.Я. Коць, С.К. Береговенко, Н.В. Кириченко, Н.Н. Мельникова. – К.: Наук. Думка, 2007. – 314 с.

52. Оценка транскрипционной активности гена абсцизной альдегидоксидазы у *Quercus robur* L. в условиях засухи / Е.В. Калмыкова, П.А. Крылов, П.А. Зыбинская, П. А. Кузьмин // Научно-агрономический журнал. – 2024. – № 3(126). – С. 55–59.

53. Павлюшин, В.А. Перспективы и возможности микробиологической защиты растений для повышения уровня экологической безопасности в агроценозах (обзор) / В.А. Павлюшин, И.И. Новикова, И.В. Бойкова // Защита и карантин растений. – 2022. – № 4. – С. 10–18.

54. Перспективы использования микробных препаратов для снижения окислительного стресса сельскохозяйственных растений / И.С. Милентьева, Н.В. Фотина, М.Ю. Жарко, Л.А. Проскуракова // Техника и технология пищевых производств. – 2022. – Т. 52(4). – С. 750–761.

55. Перспективы применения натурального растительного сырья для расширения ассортимента специализированных продуктов геродиетического назначения / В.В. Абушаева, Л.В. Донченко, М.В. Лукьяненко, Е.Н. Чеботарева и др. // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. – 2023. – № 3. – С. 60–68.

56. Поиск новых генотипов риса с устойчивостью к глубоководному затоплению / Н.Г. Черткова, П.И. Костылев, А.В. Усатов, Н.Г. Дуплий и др. // Биотехнология. – 2024. – Т. 40(6). – С. 33–40.

57. Попова, В.П. Перспектива применения биостимуляторов роста для повышения устойчивости и стабильности плодоношения плодовых культур / В.П. Попова, Р.А. Оплачко, Е.А. Оплачко // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2021. – № 72(6). – С. 176–221.

58. Применение эндофитных микроорганизмов для интенсификации ростовых процессов сельскохозяйственных культур / Е.Р. Фасхутдинова, Н.Н. Богачева, Е.Е. Бородина, А.В. Позднякова и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2024. – Т. 54(4). – С. 820–836.

59. Продуцирующие фитогормоны эндофитные бактерии рода *Bacillus* для увеличения урожайности томатов в условиях закрытого грунта / С.В. Веселова, С.Д. Румянцев, С.В. Максимов и др. // Таврический вестник аграрной науки. – 2025. – № 3(43). – С. 54–68.

60. Пронин, А.С. Синтез индол-3-уксусной кислоты при совместном культивировании дрожжей и бактерий / А.С. Пронин, Т.С. Колмыкова, А.С. Лукаткин // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2023. – Т. 85(4). – С. 91–95.

61. Профилактика хронических неинфекционных заболеваний в Российской Федерации. Национальное руководство 2022 / О.М. Драпкина, А.В. Концевая, А.М. Калинина, С.Н. Авдеев и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21. – № 4. – С. 5–232.

62. Ризобактерии для снижения биотического стресса яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), вызванного фитопатогенными грибами / Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина, Л.К. Асякина, И.С. Милентьева и др. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2023. – № 4. – С. 98–113.

63. Роль *Bacillus amyloliquefaciens* в снижении абиотического стресса зерновых культур / Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина, Л.К. Асякина, А.Ю. Просеков и др. // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2023. – Т. 12. – № 4 (64). – С. 178–183.

64. Роль цитокининов в стресс-устойчивости растений / Д.С. Веселов, Г.Р. Кудоярова, Н.В. Кудрякова, В.В. Кузнецов // Физиология растений. – 2017. – Т. 64(1). – С. 19–32.

65. Светлакова, Н.А. Перспективные методы восстановления сельскохозяйственных земель в Кузбассе / Н.А. Светлакова, Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина // Материалы X Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии». – Кемерово, 2022. – С. 526–528.

66. Связь накопления биомассы корней с содержанием и метаболизмом цитокининов у нечувствительных к этилену растений / А.В. Коробова, Л.Б. Высоцкая, А.Н. Васинская, Б.Р. Кулуев и др. // Физиология растений. – 2016. – Т. 63. – № 5. – С. 636–643.

67. Серазетдинова, Ю.Р. Аспекты применения симбиотической фиксации азота для улучшения питания зерновых культур / Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина, Е.Р. Фасхутдинова // Материалы XII Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии». – Кемерово, 2024. – С. 356–357.

68. Серазетдинова, Ю.Р. Эндوفиты, как агенты в борьбе с окислительным стрессом сельскохозяйственных культур / Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина // В сборнике научных трудов 76-й Научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Современные проблемы агропромышленного комплекса». – Самара, 2023. – С. 106–110.

69. Серазетдинова, Ю.Р. Эффективность применения ростостимулирующих ризобактерий для защиты сельскохозяйственных культур от абиотического стресса / Ю.Р. Серазетдинова, Н.В. Фотина, А.Ю. Просеков // Материалы XII Инновационного конвента «Кузбасс: образование, наука, инновации». – Кемерово, 2024. – С. 325–328.

70. Синтез производных изоникотиновой и салициловой кислот из (-)- α -пинена и (+)- Δ^3 -карена / Ю.В. Мясоедова, Э.Р. Нуриева, Л.Р. Гарифуллина, Г.Ю. Ишмуратов // Журнал общей химии. – 2020. – Т. 90(11). – С. 1654–1660.

71. Современное состояние проблемы азота в мировом земледелии / А.А. Завалин, Г.Г. Благовещенская, Н.Я. Шмырева, Л.С. Чернова и др. // Агрохимия. – 2015. – № 5. – С. 83–95.

72. Сортовая специфичность эффектов ризобактерий в отношении азотфиксирующего симбиоза и минерального питания сои в условиях агроценоза / Ю.В. Береговая, И.Л. Тычинская, С.Н. Петрова и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 5. – С. 977–993.

73. Состав корневых экзометаболитов мягкой пшеницы и томата, влияющих на растительно-микробные взаимодействия в ризосфере / Л.В. Кравченко, А.И. Шапошников, Н.М. Макарова, Т.С. Азарова и др. // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – С. 781–786.

74. Тимофеева, А.М. Биологическая активность почвенных бактерий, стимулирующих рост растений: фиксация азота, солюбилизация фосфата, синтез сидерофоров. Перспективы разработки микробных консорциумов / А.М. Тимофеева, М.Р. Галямова, С.Е. Седых // Агрохимия. – 2024. – № 5. – С. 85–95.

75. Травмирование семян озимой мягкой пшеницы как показатель снижения ее посевных качеств / Е.В. Ионова, Ю.Г. Скворцова, Г.А. Филенко, Т.И. Фирсова // Зерновое хозяйство России. – 2019. – № 6(66). – С. 68–71.

76. Трепачев, Е.П. Симбиотическая азотфиксация как фактор экологической безопасности и плодородия почвы / Е.П. Трепачев // Экологические приемы химизации в интенсивном земледелии: сб. науч. тр. – М., 1990. – С. 79–83.

77. Физиолого-биохимические ответы растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), зараженных грибом *Alternaria alternata*, на применение микробных препаратов на основе *Bacillus subtilis* / О.В. Ласточкина, Л.И. Пусенкова, Р.А. Юлдашев и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – № 5. – С. 958–968.

78. Филиппова, Г.Г. Роль пептидных гормонов в регуляции роста и развития растений и их адаптации к внешним факторам / Г.Г. Филиппова // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2024. – № 2. – С. 4–23.

79. Фитогормоны и абиотические стрессы (обзор) / Л.В. Чумикина, Л.И. Арабова, В.В. Колпакова, А.Ф. Топунов // Химия растительного сырья. – 2021. – № 4. – С. 5–30.

80. Шешегова, Т.К. Новые биоудобрения в технологии возделывания яровых зерновых культур / Т.К. Шешегова, Л.М. Щеклеина, Г.А. Серкова // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2023. – № 2(67). – С. 125–132.
81. Щеклеина, Л.М. Вредоносность фузариоза колоса яровой пшеницы и поиск устойчивых генотипов для селекции / Л.М. Щеклеина, Т.К. Шешегова // Пермский аграрный вестник. – 2024. – № 3(47). – С. 64–70.
82. Экстремофильные микроорганизмы-продуценты гиббереллиновой кислоты / Н.Н. Хорошкина, М.В. Безъязыкова, Е.Р. Фасхутдинова, Н.В. Фотина // Материалы II Международного Симпозиума, посвященный 50-летию КемГУ «Пищевые здоровьесберегающие технологии». – Кемерово, 2023. – С. 160–162.
83. Экстремофильные микроорганизмы-продуценты идолил-3-уксусной кислоты, перспектива использования в качестве биоудобрения / Е.Е. Бородина, Н.В. Фотина, Л.К. Асякина, Ю.В. Голубцова // Материалы XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии». – Кемерово, 2023. – С. 326–327.
84. A novel fungicide consortium: is it better for wheat production and how does it affect rhizosphere microbiome? / L. Asyakina, P. Barsukov, Y. Serazetdinova, N. Fotina et al. // Applied Microbiology. – 2025. – Vol. 5. – № 4. – P. 142.
85. A two-gene strategy increases iron and zinc concentrations in wheat flour, improving mineral bioaccessibility / S.A. Harrington, J.M. Connorton, N.I. Nyangoma et al. // Plant physiology. – 2023. – Vol. 191(1). – P. 528–541.
86. Abdoulaye, S. Potassium sources, microorganisms and plant nutrition: Challenges and future research directions / S. Abdoulaye, S. Djibril, G.D. Abdala // Pedosphere. – 2023. – Vol. 33(1). – P. 105–115.
87. Absciscic acid dynamics, signaling, and functions in plants / J. Integr, K. Chen, G.-J. Li, R.A. Bressan et al. // Plant Biol. – 2020. – Vol. 62. – P. 25–54.
88. Absciscic acid-utilizing rhizobacteria disturb nitrogen-fixing symbiosis of pea *Pisum sativum* L / A. Belimov, A. Shaposhnikov, V. Safronova, Yu. Gogolev // Biological Communications. – 2020. – Vol. 65. – № 4. – P. 283–287.

89. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant / H. Sakakibara, H. Kasahara, N. Ueda et al. // *Biological sciences*. – 2005. – Vol. 102. – P. 9972–9977.
90. Agroecological Management of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea* by Plant Growth-Promoting Bacteria / M.d.C. Orozco-Mosqueda, A. Kumar, A.E. Fadiji, O.O. Babalola et al. // *Plants*. – 2023. – Vol. 12(3). – P.637.
91. Al-Babili, S. Strigolactones, a Novel Carotenoid-Derived Plant Hormone / S. Al-Babili, H.J. Bouwmeester // *Annual Review of Plant Biology* – 2015. – Vol. 66. – № 1. – P. 161–186.
92. Alphaproteobacteria communities depend more on soil types than land managements / O. Gazdag, T. Takács, L. Ködöböcz, G. Krett et al. // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*. – 2018. – Vol. 69(2). – P. 147–154.
93. Al-Sadi, A.M. *Bipolaris sorokiniana* – Induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: a review / A.M. Al-Sadi // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 584899.
94. An, C. Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity / C. An, Z. Mou // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2011. – Vol. 53. – P. 412–428.
95. Antagonistic activity of extremophilic bacteria against phytopathogens in agricultural crops / L.K. Asyakina, Yu.R. Serazetdinova, A.S. Frolova, N.V. Fotina et al. // *Food Processing: Techniques and Technology*. – 2023. – Vol. 53. – I. 3. – P. 565–575.
96. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides* / V. Choub, S-J. Won, H.B. Ajuna, J-H. Moon et al. // *Horticulturae*. – 2022. – Vol. 8. – № 6. – P. 557.
97. antiSMASH 8.0: Extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation / K. Blin, S. Shaw, L. Vader et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2025. – Vol. 53. – P. 32–38.
98. Antoniwi, J.F. The Effects of Aspirin and Polyacrylic Acid on Soluble Leaf Proteins and Resistance to Virus Infection in Five Cultivars of Tobacco / J.F. Antoniwi, R.F. White // *Journal of Phytopathology*. – 1980. – Vol. 98. – P. 331–341.

99. Assembly of Long Error-Prone Reads Using Repeat Graphs / M. Kolmogorov, J. Yuan, Y. Lin, P. Pevzner // *Nature Biotechnology*. – 2019. – Vol. 37. – P. 540–546.
100. Astaneh, R.K. Exogenous nitric oxide protect garlic plants against oxidative stress induced by salt stress / R.K. Astaneh, S. Bolandnazar, F.Z. Nahandi // *Plant Stress*. – 2022. – Vol. 5. – P. 100101.
101. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* Hydrolyze Conjugates of GA20 and Metabolize the Resultant Aglycones to GA1 in Seedlings of Rice Dwarf Mutants / F. Cassán, R. Bottini, G. Schneider, P. Piccoli // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 125(4). – P. 2053–2058.
102. Bacterial Carotenoids: Extraction, Characterization, and Applications / G.D. López, G. Álvarez-Rivera, C. Carazzone et al. // *Crit Rev Anal Chem*. – 2023. – Vol. 53(6). – P. 1239–1262.
103. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification / O. Schwengers, L. Jelonek, M.A. Dieckmann et al. // *Microbial Genomics*. – 2021. – Vol. 7(11). – P. 000685.
104. Binder, B.M. Ethylene signaling in plants / B.M. Binder // *JBC*. – 2020. – Vol. 295(22). – P. 7710–7725.
105. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to «stress ethylene» produced in plants / R.P. Singh, G.M. Shelke, A. Kumar, P.N. Jha // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 937. 84
106. Bio-control efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric / C. Chenniappan, M. Narayanasamy, G.M. Daniel, G.B. Ramaraj et al. // *Biological Control*. – 2019. – Vol. 129. – P. 55–64.
107. Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety / A.I. Daniel, A.O. Fadaka, A. Gokul, O.O. Bakare et al. // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10(6). – P. 1220.
108. Biofortification and bioavailability of Zn, Fe and Se in wheat: present status and future prospects / P.K. Gupta, H.S. Balyan, S. Sharma et al. // *Theor Appl Genet*. – 2021. – Vol. 134. – P. 1–35.
109. Biological control of plant pathogens by *Bacillus species* / D. Fira, I. Dimkić, T. Berić, J. Lozo et al. // *Journal of Biotechnology*. – 2018. – Vol. 285. – P. 44–55.

110. Biosynthesis of abscisic acid in fungi: identification of a sesquiterpene cyclase as the key enzyme in *Botrytis cinerea* / I. Izquierdo-Bueno, V.E. González-Rodríguez, A. Simon et al. // *Environ Microbiol.* – 2018. – Vol. 20(7). – P. 2469–2482.
111. Bottini, R. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase / R. Bottini, F. Cassán, P. Piccoli // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2004. – Vol. 65. – P. 497–503.
112. Bread wheat genetic variation for grain's protein, iron and zinc concentrations as uptake by their genetic ability / R. Amiri, S. Bahraminejad, S. Sasani et al. // *European Journal of Agronomy.* – 2015. – Vol. 67. – P. 20–26.
113. BUSCO: Assessing genomic data quality and beyond / M. Manni, M.R. Berkeley, M. Seppey, E.M. Zdobnov // *Current Protocols.* – 2021. – Vol. 1. – P. e323.
114. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium / L. Zhang, M. Xu, Y. Liu et al. // *New Phytol.* – 2016. – Vol. 210. – P. 1022–1032.
115. Carotenoids are used as regulators for membrane fluidity by *Staphylococcus xylosus* / W. Seel, D. Baust, D. Sons et al. // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10(1). – P. 330.
116. Carotenoids improve bacterial tolerance towards biobutanol through membrane stabilization / G.W.N. Chia, T. Seviour, S. Kjelleberg et al. // *Environ Sci Nano.* – 2021. – Vol. 8. – P. 328–341.
117. Chang, C. Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? / C. Chang // *BMC Biol.* – 2016. – Vol. 14. – P. 7.
118. Climate Change and Its Impact on Crops: A Comprehensive Investigation for Sustainable Agriculture / A. Kumari, G.A. Lakshmi, G.K. Krishna et al. // *Agronomy.* – 2022. – Vol. 12(12). – P. 3008.
119. Comparison of effects of bacterial strains differing in their ability to synthesize cytokinins on growth and cytokinin content in wheat plants / T.N. Arkhipova, S.Yu. Veselov, A.I. Melent'ev et al. // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2006. – Vol. 53. – P. 507–513.

120. Connected Food: First Steps for an Ambitious National Food Strategy / N.B. Boyle, V. Jenneson, N. Okeke-Ogbuafor, M.A. Morris et al. // *Nutrients*. – 2024. – Vol. 16(19). – P. 3371.

121. Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of pseudomonas strains against phytophthora infestans / A. Anand, D. Chinchilla, C. Tan, L. Mène-Saffrané et al. // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 8. – P. 1144.

122. Das, S. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay / S. Das, T.K. De // *MethodsX*. – 2018. – Vol. 5. – P. 909–914.

123. Di Francesco, A. How siderophore production can influence the biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* against *Monilinia laxa* on peaches / A. Di Francesco, E. Baraldi // *Biological Control*. – 2021. – Vol. 152. – P. 104456.

124. Difficulties in identification of *Comamonas kerstersii* strains isolated from intestinal microbiota of residents of republic of Guinea and Russian federation / E.V. Voitenkova, Z.N. Matveeva, M.A. Makarova, S.A. Egorovaets // *Russian Journal of Infection and Immunity*. – 2018. – Vol. 8(2). – P. 163–168.

125. Does a decrease in microbial biomass alter mycorrhizal attributes and soil quality indicators in coal mining areas under revegetation process? / C.K. Vieira, L.G.A. Borges, J.G. Bortolini, C.R. Fonseca et al. // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 802. – P. 149843.

126. Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth / R. Abdenaceur, B.T. Farida, D. Mourad, H. Rima et al. // *International Microbiology*. – 2022. – Vol. 25(4). – P. 817–829.

127. Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity / D. Nassal, M. Spohn, N. Eltlbany et al. // *Plant Soil*. – 2018. – Vol. 427. – P. 17–37.

128. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene / R.E. Sharp, M.E. LeNoble, M.A. Else et al. // *J Exp Bot*. – 2000. – Vol. 350. – P. 1575–1584.

129. Endophytes from *Gnetum gnemon* L. can protect seedlings against the infection of phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* as well as promote plant

growth in tomato / H. Agarwal, B. Dowarah, P.M. Baruah, K.S. Bordoloi et al. // Microbiological Research. – 2020. – Vol. 238. – P. 126503.

130. Enhancement of wheat growth by plant growth-stimulating bacteria during phytopathogenic inhibition / N.V. Fotina, Yu.R. Serazetdinova, D.E. Kolpakova, L.K. Asyakina et al. // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2024. – Vol. 60. – P. 103294.

131. Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions / L.K. Asyakina, E.E. Vorob'eva, L.A. Proskuryakova, M.Yu. Zharko // Foods and Raw Materials. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 162–171.

132. Evangelista-Martínez, Z. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens / Z. Evangelista-Martínez // World J Microbiol Biotechnol. – 2014. – Vol. 30. – № 5. – P. 1639–1647.

133. Exogenous application of indole-3-acetic acid to ameliorate salt induced harmful effects on four eggplants (*Solanum melongena* L.) varieties / K. Shahzad, E.H. Siddiqi, S. Ahmad, U. Zeb et al. // Scientia Horticulturae. – 2022. – Vol. 292. – P. 110662.

134. Extremophilic bacteria as biofertilizer for agricultural wheat / E.R. Faskhutdinova, N.V. Fotina, O.A. Neverova, Yu.V. Golubtsova et al. // Foods and Raw Materials. – 2024. – Vol. 12. – № 2. – P. 348–360.

135. Farzadfar, S. Soil organic nitrogen: an overlooked but potentially significant contribution to crop nutrition / S. Farzadfar, J.D. Knight, K.A. Congreves // Plant Soil. – 2021. – Vol. 426. – P. 7–23.

136. Filtlong [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://github.com/rrwick/Filtlong>.

137. First Report of *Fusarium graminearum* Causing Fusarium Head Blight of Wheat and Barley in the Lower Mainland of British Columbia, Canada / Y. Zhang, S. Dhaliwal, J. Bamforth, S. Kurera et al. // Plant Dis. – 2023. – Vol. 107(8). – P. 2531.

138. Garvin, D.F. Historical shifts in the seed mineral micronutrient concentration of US hard red winter wheat germplasm / D.F. Garvin, R.M. Welch,

J.W. Finley // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2006. – Vol. 86(13). – P. 2213–2220.

139. Genetic factors affecting Fusarium head blight resistance improvement from introgression of exotic Sumai 3 alleles (including Fhb1, Fhb2, and Fhb5) in hard red spring wheat / G.S. Brar, A.L. Brûlé-Babel, Yu. Ruan, M.A. Henriquez et al. // BMC Plant Biology. – 2019. – Vol. 19. – P. 179.

140. Genetic variation, heritability, genetic advance, micronutrients, and grain morphology trait associations in EMS induced mutant lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Kumar, A. Kumar, A. Mishra et al. // Genet Resour Crop Evol. – 2022. – Vol. 69. – P. 2141–2158.

141. Genetics of Fe, Zn, β -carotene, GPC and yield traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using multi-locus and multi-traits GWAS / J. Kumar, G. Saripalli, V. Gahlaut et al. // Euphytica. – 2018. – Vol. 214. – P. 219.

142. Genome-wide association study for grain zinc concentration in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Ma, M. Ye, Q. Liu et al. // Frontiers in Plant Science. – 2023. – Vol. 14. – P. 1169858.

143. Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments / S.A. Eichorst, D. Trojan, S. Roux, C. Herbold et al. // Environmental Microbiology. – 2018. Vol. 20(3). – P. 1041–1063.

144. Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum* / D. Morrone, J. Chambers, L. Lowry et al. // FEBS Letters. – 2009. – Vol. 583(2). – P. 475–480.

145. Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones / S.M. Kang, A.L. Khan, M. Hamayun et al. // J Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – P. 902–909.

146. Gibson-Moore, H. Vitamin D: What's new a year on from the COVID-19 outbreak? / Gibson-Moore, H. // Nutrition Bulletin. – 2021. – Vol. 46(2). – P. 195.

147. Glick, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications / B.R. Glick // Scientifica. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–15.

148. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database / P.A. Chaumeil, A.J. Mussig, P. Hugenholtz, D.H. Parks // *Bioinformatics*. – 2019. – Vol. 36. – P. 1925–1927.
149. Hannes, L. Salicylic Acid Biosynthesis in Plants / L. Hannes, B. Lander, G. Godelieve // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11 – P. 00338.
150. Harding, K.L. Hidden hunger in South Asia: a review of recent trends and persistent challenges / K.L. Harding, V.M. Aguayo, P. Webb // *Public Health Nutrition*. – 2018. – Vol. 21(4). – P. 785–95.
151. Hedden, P. A Century of Gibberellin Research / P. Hedden, V. Sponsel // *J Plant Growth Regul.* – 2015. – Vol. 34. – P. 740–760.
152. Hydrolytic Capabilities as a Key to Environmental Success: Chitinolytic and Cellulolytic Acidobacteria From Acidic Sub-arctic Soils and Boreal Peatlands / S.E. Belova, N.V. Ravin, N.V. Ravin, T.A. Pankratov et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2775.
153. IMG-ABC: A Knowledge Base To Fuel Discovery of Biosynthetic Gene Clusters and Novel Secondary Metabolites / M. Hadjithomas, I-M. Chen, K. Chu, A. Ratner et al. // *mBio*. – 2015. – Vol. 6(4). – P. 2161–2129.
154. Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes / Yo. Zhang, Ya. Li, M.J. Hassan, Z. Li et al. // *BMC Plant Biology*. – 2020. – Vol. 20. – P. 150.
155. Influence of gibberellic acid and different salt concentrations on germination percentage and physiological parameters of oat cultivars / A. Chauhan, B.A. AbuAmarah, A. Kumar, J.S. Verma et al. // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2019. – Vol. 26(6). – P. 1298–1304.
156. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa* / R. Shahzad, A.L. Khan, S. Bilal et al. // *Environmental and Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 136. – P. 68–77.

157. Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation / D.K. Choudhary, A. Prakash, V. Wray, B.N. Johri // Current Science. – 2009. – Vol. 97(2). – P. 170–179.
158. Isolation and evaluation of the antagonistic activity of *Cnidium officinale* rhizosphere bacteria against phytopathogenic fungi (*Fusarium solani*) / S.H. Lee, S.H. Jeon, J.Y. Park, D.S. Kim et al. // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – P. 1555.
159. Kaur, G. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites / G. Kaur, M.S. Reddy // Eur J Soil Biol. – 2014. – Vol. 61. – P. 35–40.
160. Khalid, A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat / A. Khalid, M. Arshad, Z.A. Zahir // Journal of Applied Microbiology. – 2004. – Vol. 96(3). – P. 473–480.
161. Khalid, A. Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage proteins in bread making quality / A. Khalid, A. Hameed, M.F. Tahir // Frontiers in Nutrition. – 2023. – Vol. 10. – P. 1053196.
162. Kobayashi, T. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants / T. Kobayashi, N.K. Nishizawa // Annu Rev Plant Biol. – 2012. – Vol. 63. – P. 131–152.
163. Köhl, J. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy / J. Köhl, R. Kolnaar, W.J. Ravensberg // Front Plant Sci. – 2019. – Vol. 10. – P. 845.
164. Konopka, K. Aerobactin-mediated utilization of transferrin iron / K. Konopka, A. Bindereif, J.B. Neilands // Biochemistry. – 1982. – Vol. 21(25). – P. 6503–6508.
165. Kutman, U.B. Improved nitrogen status enhances zinc and iron concentrations both in the whole grain and the endosperm fraction of wheat / U.B. Kutman, B.Yildiz, I. Cakmak // Journal of Cereal Science. – 2011. – Vol. 53(1). – P. 118–125.
166. Kuypers, M. The microbial nitrogen-cycling network / M. Kuypers, H. Marchant, B. Kartal // Nat Rev Microbiol. – 2018. – Vol. 16. – P. 263–276.

167. Lambari, N. Curative effect of ascorbic acid and gibberellic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) metabolism under salinity stress / N. Lambari, C. Mandavia, S.S. Ganesh // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. – 2018. – Vol. 7. – P. 522–533.
168. Leisner, C.P. Climate change impacts on food security-focus on perennial cropping systems and nutritional value / C.P. Leisner // Plant Science. – 2020. – Vol. 293. – P. 110412.
169. Lowe, N.M. The global challenge of hidden hunger: perspectives from the field / N.M. Lowe // Proceedings of the Nutrition Society. – 2021. – Vol. 80(3). – P. 283–289.
170. Macmillan, J. Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria / J. Macmillan // J Plants Growth Refill. – 2002. – Vol. 20. – P. 387–442.
171. Marcel, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads / M. Marcel // EMBnet journal. – 2011. – Vol. 17(1). – P. 10.
172. Mayer, A.M.B. Historical changes in the mineral content of fruit and vegetables in the UK from 1940 to 2019: a concern for human nutrition and agriculture / A.M.B. Mayer, L. Trenchard, F. Rayns // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2021. – Vol. 73(3). – P. 315–326.
173. Medaka [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://github.com/nanoporetech/medaka>.
174. Metabolic Versatility and Antibacterial Metabolite Biosynthesis Are Distinguishing Genomic Features of the Fire Blight Antagonist *Pantoea vagans* C9-1 / T.H.M. Smits, F. Rezzonico, T. Kamber et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6(7). – e22247.
175. Microbial modulation of plant ethylene signaling: ecological and evolutionary consequences / M. Ravanbakhsh, R. Sasidharan, L.A.C.J. Voesenek et al. // Microbiome. – 2018. – Vol. 6. – P. 52.
176. Mishra, A.K. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism: A Divergent Pathway for Plants and Bacteria / A.K. Mishra, K.-H. Baek // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11. – P. 705.
177. Molecular and biochemical characterisation of antagonistic mechanisms of the biocontrol agent *Bacillus cereus* B 25 inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium verticillioides* P03 during their direct interaction in vitro / P.A. Báez-Astorga,

J.E. Cázares-Álvarez, A. Cruz-Mendivil, F.R. Quiroz-Figueroa et al. // Bio-control Science and Technology. – 2022. – Vol. 32. – № 9. – P. 1074–1094.

178. Mycorrhizal fungi: Role in the solubilization of potassium Springer / J.A. Dominguez-Nuñez, B. Benito, M. Berrocal-Lobo, A. Albanesi // New Delhi. – 2016. – P. 77–98.

179. Negatively Regulated Aerobactin and Desferrioxamine E by Fur in *Pantoea ananatis* Are Required for Full Siderophore Production and Antibacterial Activity, but Not for Virulence / O. Choi, J. Cho, B. Kang et al. // Appl Environ Microbiol. – 2022. – Vol. 88. – e02405-21.

180. Nutrient biofortification in wheat: opportunities and challenges / S.K. Singh, M. Barman, A. Sil et al. // Cereal research communications. – 2023. – Vol. 51. – P. 15–28.

181. Patel, M. Salinity alleviates the arsenic toxicity in the facultative halophyte *Salvadora persica* L. by the modulations of physiological, biochemical, and ROS scavenging attributes / M. Patel, A.K. Parida // Journal of Hazardous Materials. – 2021. – Vol. 401. – P. 123368.

182. Patel, P. Iron biofortification in mungbean using siderophore producing plant growth promoting bacteria / P. Patel, G. Trivedi, M. Saraf // Environmental Sustainability. – 2018. – Vol. 1(4). – P. 357–365.

183. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review / S. Fahad, S. Hussain, A. Matloob, F.A. Khan et al. // Plant Growth Regul. – 2015. – Vol. 75. – № 2. – P. 391–404.

184. Plant growth promoting rhizobacteria: an alternate way to improve yield and quality of wheat (*Triticum aestivum*) / M. Abaid-Ullah, M.N. Hassan, M.J. Muhammad Jamil et al. // International journal of agriculture & biology. – 2015. – Vol. 17. – P. 51–60.

185. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria / L.C. Parsley, J. Linneman, A.M. Goode, K. Becklund et al. // FEMS Microbiol Ecol. – 2011. – Vol. 78(1). – P. 176–87.

186. Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor / L.G. Sarmiento-Lopez, M. Lopez-Meyer, I.E. Maldonado-

Mendoza, F.R. Quiroz-Figueroa et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2022. – Vol. 1(134). – P. 21–28.

187. Production of plant-based fermented beverages possessing functional ingredients antioxidant, γ -aminobutyric acid and antimicrobials using a probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strain L42g as an efficient starter culture / A. Buatong, R. Meidong, Ya. Trongpanich, S. Tongpim // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2022. – Vol. 134(3). – P. 226–232.

188. Restoration of *Triticum aestivum* Growth under Salt Stress by Phosphate-Solubilizing Bacterium Isolated from Southern Algeria / N. Belkebla, S.A. Bessai, J. Melo, M.F. Caeiro et al. // Agronomy. – 2022. – Vol. 12(9). – P. 2050.

189. Rhizobia as complex biofertilizers for wheat: Biological nitrogen fixation and plant growth promotion / Yu.R. Serazetdinova, E.E. Borodina, N.V. Fotina, A. Naik et al. // Foods and Raw Materials. – 2026. – Vol. 14. – № 1. – P. 214–227.

190. Rock inhabiting potassium solubilizing bacteria from Kerala, India: Characterization and possibility in chemical K fertilizer substitution / I.P. Anjanadevi, N.S. John, K.S. John et al. // J Basic Microbiol. – 2016. – Vol. 56. – P. 67–77.

191. Saaka, M. Relationship between mothers' nutritional knowledge in childcare practices and the growth of children living in impoverished rural communities / M. Saaka // Journal of health, population, and nutrition. – 2014. – Vol. 32(2). – P. 237–248.

192. Sandmann, G. Antioxidant Protection from UV- and Light-Stress Related to Carotenoid Structures / G. Sandmann // Antioxidants. – 2019. – Vol. 8. – P. 219.

193. Schalk, I.J. Minireview new roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance / I.J. Schalk, M. Hannauer, F. Braud // Environ Microbiol. – 2011. – Vol. 13. – P. 2844–2854.

194. Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition / M. Schiavon, S. Nardi, F. dalla Vecchia et al. // Plant Soil. – 2020. – Vol. 453. – P. 245–270.

195. Shekafandeh, A. Influence of gibberellin on increasing of sodium chloride tolerance via some morpho-physiological changes in two olive cultivars /

A. Shekafandeh, S. Sirooeenejad, E. Alsmoushtaghi // *Agriculturae Conspectus Scientificus*. – 2017. – Vol. 82(4). – P. 367–373.

196. Sheng, X.F. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat Can / X.F. Sheng, L.Y. He // *J Microbiol*. – 2006. – Vol. 52. – P. 66–72.

197. Shohat, H. Gibberellin in tomato: metabolism, signaling and role in drought responses / H. Shohat, N.I. Eliaz, D. Weiss // *Molecular Horticulture*. – 2021. – Vol. 1. – P. 15.

198. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential / B.R. Wilson, A.R. Bogdan, M. Miyazawa et al. // *Trends Mol Med*. – 2016. – Vol. 22(12). – P. 1077–1090.

199. Siebner-Freibach, H. Siderophores sorbed on Ca-montmorillonite as an iron source for plants / H. Siebner-Freibach, Y. Hadar, Y. Chen // *Plant Soil*. – 2003. – Vol. 251. – P. 115–124.

200. Silva, T. Elongation rates and endogenous indoleacetic acid levels in roots of pea mutants differing in internode length / T. Silva, P.J. Davies // *Physiologia Plantarum*. – 2007. – Vol. 129(4). – P. 804–812.

201. Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures / A. Cordova-Rodriguez, M.E. Rentería-Martínez, C.A. López-Miranda, J.M. Guzmán-Ortíz et al. // *MethodsX*. – 2022. – Vol. 9. – P. 101917.

202. Soil zinc, serum zinc, and the potential for agronomic biofortification to reduce human zinc deficiency in Ethiopia / H. De Groote, M. Tessema, S. Gameda et al. // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11. – P. 8770.

203. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov et al. // *Journal of Computational Biology*. – 2012. – Vol. 19(5). – P. 455–477.

204. Stangoulis, J.C.R., Biofortification of major crop plants with iron and zinc – achievements and future directions / J.C.R. Stangoulis, M. Knez // *Plant Soil*. – 2022. – Vol. 474. – P. 57–76.

205. Straw competition and wheat root endophytism of *Trichoderma gamsii* t6085 as useful traits in the bio-logical control of fusarium head blight / S. Sarrocco, P. Esteban, I. Vicente, R. Bernardi et al. // *Phytopathology*. – 2021. – Vol. 111. – № 7. – P. 1129–1136.

206. Suppression of Grape White Rot Caused by *Coniella vitis* Using the Potential Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* GSBZ09 / X. Yin, T. Li, X. Jiang, X. Tang et al. // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11. – № 2. – P. 248.

207. The biopotential of extremophilic microorganisms isolated from Kuzbass for protection and growth stimulation of oat (*Avena sativa* L.) / Yu. Serazetdinova, E. Borodina, D. Kolpakova, N. Fotina et al. // *BIO Web of Conferences: International Scientific and Practical Conference «Methods for Synthesis of New Biologically Active Substances and Their Application in Various Industries of the World Economy – 2023» (MSNBAS2023)*. – Moscow, 2023. – Vol. 82. – P. 03009.

208. The destructive fungal pathogen botrytis cinerea—insights from genes studied with mutant analysis / N. Cheung, L. Tian, X. Liu, X. Li // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9(11). – P. 923.

209. The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes / A.M. Kielak, C.C. Barreto, C.C. Barreto, G.A. Kowalchuk et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 744.

210. The first representative of the globally widespread subdivision 6 Acidobacteria, *Vicinamibacter silvestris* gen. nov., sp. nov., isolated from subtropical savannah soil / K.J. Huber, A.M. Geppert, G. Wanner, B.U. Fösel et al. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – Vol. 66. – P. 2971–2979.

211. The importance of phytohormones and microbes in biofertilizers. in: maheshwari, d. (eds) *bacterial metabolites in sustainable agroecosystem* / W.S. Wong, S.N. Tan, L. Ge et al. // *Sustainable Development and Biodiversity* – 2015. – Vol. 12. – P. 105–158.

212. The potential impact of climate change on the micronutrient-rich food supply / R.D. Semba, S. Askari, S. Gibson et al. // *Advances in Nutrition*. – 2022. – Vol. 13(1). – P. 80–100.

213. The reduction in maize leaf growth under mild drought affects the transition between cell division and cell expansion and cannot be restored by elevated gibberellic acid levels / H. Nelissen, X.H. Sun, B. Rymen, Y. Jikumaru et al. // Plant Biotechnol J. – 2018. – Vol. 16(2). – P. 615–27.
214. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper / X. Yu, C. Ai, L. Xin et al. // Eur J Soil Biol. – 2011. – Vol. 47. – P. 138–145.
215. The small unicellular diazotrophic symbiont, UCYN-A, is a key player in the marine nitrogen cycle / C. Martinez-Perez, W. Mohr, C.R. Löscher et al. // Nat. Microbiol. – 2016. – Vol. 1. – P. 16163.
216. The State of Food Security and Nutrition in the World 2024 / FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. – Rome: FAO, 2024. – 286 p.
217. The zeamine antibiotics affect the integrity of bacterial membranes / J. Masschelein, C. Clauwers, K. Stalmans et al. // Appl Environ Microbiol. – 2015. – Vol. 81(3). – P. 1139–1146.
218. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils / N.L. Ward, J.F. Challacombe, P.H. Janssen, B. Henrissat et al. // Appl Environ Microbiol. – 2009. – Vol. 75(7). – P. 2046–56.
219. Timofeeva, A.M. Bacterial Siderophores: Classification, Biosynthesis, Perspectives of Use in Agriculture / A.M. Timofeeva, M.R. Galyamova, S.E. Sedykh // Plants. – 2022. – Vol. 11. – 3065.
220. Transcriptome profiling reveals phase-specific gene expression in the developing barley inflorescence / H. Liu, G. Li, X. Yang et al. // The Crop Journal. – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. 71–86.
221. Trycycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes / R.R. Wick, L.M. Judd, L.T. Cerdeira et al. // Genome Biology. – 2021. – Vol. 22. – P. 266.
222. Ultra-processed foods and human health: from epidemiological evidence to mechanistic insights / B. Srour, M.C. Kordahi, E. Bonazzi, M. Deschasaux-Tanguy et al. // The lancet Gastroenterology & hepatology. – 2022. – Vol. 7(12). – P. 1128–1140.

223. Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national trends, food systems transformations and political economy drivers / P. Baker, P. Machado, T. Santos, K. Sievert et al. // *Obesity Reviews*. – 2020. – Vol. 21(12). – P. e13126.

224. Unveiling Biosynthesis of the Phytohormone Absciscic Acid in Fungi: Unprecedented Mechanism of Core Scaffold Formation Catalyzed by an Unusual Sesquiterpene Synthase / J. Takino, T. Kozaki, Y. Sato et al. // *J Am Chem Soc*. – 2018. – Vol. 140(39). – P. 12392–12395.

225. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores / J.P. Bellenger, T. Wichard, A.B. Kustka et al. // *Nat Geosci*. – 2008. – Vol. 1. – P. 243–246.

226. Van de, P.B. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! / P.B. Van de, S.D. Van Der // *Front. Plant Sci*. – 2014. – Vol. 5. – P. 640.

227. Vitousek, P.M. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? / P.M. Vitousek, R.W. Howarth // *Biogeochemistry*. – 1991. – Vol. 13. – P. 87–115.

228. Wick, R.R. Benchmarking of long-read assemblers for prokaryote whole genome sequencing / R.R. Wick, K.E. Holt // *F1000Research*. – 2019. – Vol. 8. – P. 2138.

229. Wick, R.R. Polypolish: short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies / R.R. Wick, K.E. Holt // *PLOS Computational Biology*. – 2022. – Vol. 18(1). – P. e1009802.

230. Zamioudis, C. Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria / C. Zamioudis, P. Mastranesti, P. Dhonukshe // *Plant Physiology*. – 2013. – Vol. 162. – P. 304–318.

231. Zimin, A.V. The genome polishing tool POLCA makes fast and accurate corrections in genome assemblies / A.V. Zimin, S.L. Salzberg // *PLoS computational biology*. – 2020. – Vol. 16(6). – P. e1007981.

ПРИЛОЖЕНИЯ

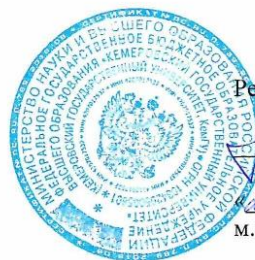
Приложение А

Копии отчетов на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Кемеровский государственный университет»

УДК 604.4:632.95
№ гос.регистрации 123032700010-1
Инвентарный № 05.01-02-12/2023



УТВЕРЖДАЮ
Ректор КемГУ
А.Ю. Просеков
А.Ю. Просеков
«*12*» 2023 г.
М.П.

ОТЧЕТ

по заданию на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности
№ FZSR-2023-0003 по теме «Фундаментальные исследования по разработке
биопестицидов, состоящих из экстремофильных и эндوفитных микроорганизмов, для
преодоления абиотического и биотического стресса сельскохозяйственными культурами в
условиях Кемеровской области – Кузбасса»

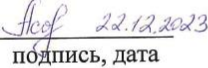
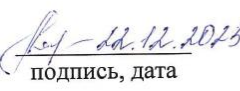
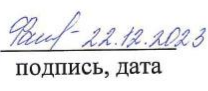
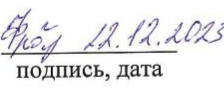
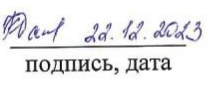
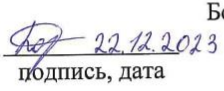
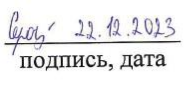
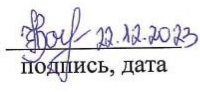
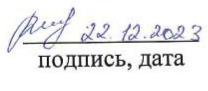
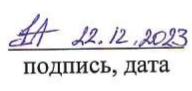
(заключительный)

Научный руководитель проекта,
доктор технических наук

Л.К. Асякина
«*25*» *12* 20*23* г.

Кемерово 2023 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

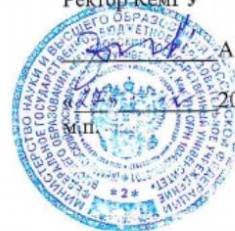
Научный руководитель проекта, зав. лабораторией фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ, д.т.н.	 подпись, дата	Асякина Л.К. (глава 1, 2, заклучение)
Исполнители:		
Научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ, к.т.н.	 подпись, дата	Карчин К.В. (глава 3, 6)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Фотина Н.В. (глава 3, 4, 5)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Фасхутдинова Е.Р. (глава 1, 3)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Фролова А.С. (глава 3, 6)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Колпакова Д.Е. (глава 4, 5)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Бородина (Воробьева) Е.Е. (глава 5, 6, заклучение)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Серазетдинова Ю.Р. (глава 1, 2, заклучение)
Младший научный сотрудник лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Богачёва (Хорошкина) Н.Н. (глава 1, 3)
Лаборант-исследователь лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Рыжкова Д.С. (глава 4)
Лаборант-исследователь лаборатории фиторемедиации техногенно нарушенных экосистем НИУ	 подпись, дата	Низоленко А.П. (глава 6)

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Кемеровский государственный университет»

УДК 604.4:631.8
№ гос. регистрации 124032800022-2
Инвентарный № 05.01-02-05/2024

УТВЕРЖДАЮ
Ректор КемГУ



А.Ю. Просеков

2024 г.

МП.

ОТЧЕТ

по заданию на выполнение государственных работ в сфере научной деятельности
№ FZSR-2024-0009 по теме «Исследование потенциала ростостимулирующих бактерий
для повышения агрономической биофортификации пшеницы»

вид отчета: промежуточный

Научный руководитель проекта,
доктор технических наук, доцент

Л.К. Асякина

«15» 12 2024 г.

Кемерово 2024 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель проекта,
зав. лабораторией фиторемедиации
техногенно нарушенных экосистем
НИУ, д.т.н.

Л.К. 23.12.2024
подпись, дата

Асякина Л.К.
(раздел 1, 2, 4,
заключение)

Исполнители:

Научный сотрудник лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ, к.т.н.

К.В. 23.12.2024
подпись, дата

Карчин К.В.
(раздел 1,
заключение)

Младший научный сотрудник
лаборатории фиторемедиации техногенно
нарушенных экосистем НИУ

Н.В. 23.12.2024
подпись, дата

Фотина Н.В.
(раздел 2, 4,
приложения)

Младший научный сотрудник
лаборатории фиторемедиации техногенно
нарушенных экосистем НИУ

Е.Р. 23.12.2024
подпись, дата

Фасхутдинова Е.Р.
(раздел 4)

Младший научный сотрудник
лаборатории фиторемедиации техногенно
нарушенных экосистем НИУ

Д.Е. 23.12.2024
подпись, дата

Колпакова Д.Е.
(раздел 1, 3,
приложения)

Младший научный сотрудник
лаборатории фиторемедиации техногенно
нарушенных экосистем НИУ

Е.Е. 23.12.2024
подпись, дата

Бородина Е.Е.
(раздел 2, 3, 4)

Младший научный сотрудник
лаборатории фиторемедиации техногенно
нарушенных экосистем НИУ

Ю.Р. 23.12.2024
подпись, дата

Серазетдинова Ю.Р.
(раздел 1, 2)

Младший научный сотрудник
лаборатории фиторемедиации техногенно
нарушенных экосистем НИУ

Н.Н. 23.12.2024
подпись, дата

Богачёва
(Хорошкина) Н.Н.
(раздел 2, 4)

Лаборант-исследователь лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ

Д.С. 23.12.2024
подпись, дата

Рыжкова Д.С.
(раздел 4)

Лаборант-исследователь лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ

А.П. 23.12.2024
подпись, дата

Низоленько А.П.
(раздел 3)

Лаборант-исследователь лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ

Ю.Е. 23.12.2024
подпись, дата

Афоница Ю.Е.
(раздел 3, 4)

Лаборант-исследователь лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ

А.Д. 23.12.2024
подпись, дата

Митина А.Д.
(раздел 4)

Приложение Б

Результаты биохимического анализа ризобактерий

Таблица П.Б-1 – Биохимические свойства грамположительных ризобактерий

Субстрат	Номер штамма																	
	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
D-amygdalin	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	+	–	+	–	–	–	+	
Phosphatidylinositol phospholipase C	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
D-xylose	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	+	
Arginine dihydrolase 1	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+	–	+	–	
Beta-galactosidase	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	–	
Alpha-glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–	
Ala-Phe-Pro Arylamidase	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	
Cyclodextrin	–	+	–	–	+	–	–	+	–	–	–	+	–	+	–	–	+	
L-Aspartate arylamidase	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	
Beta-galactopyranosidase	+	–	+	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	
Alpha-mannosidase	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Phosphatase	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	
Leucine arylamidase	+	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	–	+	–	–	+	+	
L-Proline arylamidase	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–	
Beta-glucuronidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	
Alpha-galactosidase	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	+	–	–	
L-Pyrrolydonyl-arylamidase	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	+	–	
Beta-glucuronidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	
Alanine arylamidase	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	
Tyrosine arylamidase	–	+	–	–	+	–	–	+	+	–	–	–	+	+	–	+	+	
D-sorbitol	+	–	+	+	–	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	–	+	
Urease	–	–	+	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	

Продолжение таблицы П.Б-1

Субстрат	Номер штамма																	
	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Polymixin b resistance	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	+	—	+	—	—	+	
D-galactose	+	—	+	—	—	+	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	—	
D-ribose	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	—	
L-Lactate alkalization	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	—	+	
Lactose	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	—	+	—	
Bacitracin resistance	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	
Novobiocin resistance	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	
D-mannitol	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	
D-mannose	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	—	—	+	
Methyl-B-D-Glucopyranoside	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	
Pullulan	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	
D-raffinose	+	—	+	—	—	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	
O/129 Resistance (comp.vibrio.)	+	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	
Salicin	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	
Saccharose/sucrose	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	—	+	+	+	
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	
Arginine dihydrolase 2	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	—	—	+	
Optochin resistance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	

Таблица П.Б-2 – Биохимические свойства грамположительных ризобактерий (продолжение)

Субстрат	Номер штамма																
	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	38	39	40	42
D-amygdalin	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Phosphatidylinositol phospholipase C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-xylose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–
Arginine dihydrolase 1	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	–	–	–
Beta-galactosidase	–	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
Alpha-glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Ala-Phe-Pro Arylamidase	–	+	–	–	+	–	+	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–
Cyclodextrin	–	+	–	–	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–	–	–	–
L-Aspartate arylamidase	–	–	–	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–
Beta galactopyranosidase	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+	+	+
Alpha-mannosidase	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	+
Phosphatase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Leucine arylamidase	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
L-Proline arylamidase	–	+	–	–	+	–	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Beta glucuronidase	–	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+
Alpha-galactosidase	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+	–	–	–
L-Pyrrolydonyl-arylamidase	–	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	–	+	–
Beta-glucuronidase	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+
Alanine arylamidase	+	–	–	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+	–	–	+	–
Tyrosine arylamidase	–	+	–	–	+	–	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–
D-sorbitol	+	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	+	+	+	+	+
Urease	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+
Polymixin b resistance	+	–	+	–	–	+	–	+	–	+	+	–	+	–	–	–	–

Продолжение таблицы П.Б-2

Субстрат	Номер штамма																
	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	32	33	34	38	39	40	42
D-galactose	+	—	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	+	—	—	+	—
D-ribose	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—	+	—
L-Lactate alkalization	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lactose	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+	—
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
D-maltose	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	—	+	—	—	+	—
Bacitracin resistance	+	—	—	—	—	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—
Novobiocin resistance	+	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	+	—
Growth in 6.5% NaCl	+	—	+	—	—	+	—	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
D-mannitol	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+
D-mannose	+	—	+	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	—	—	+	—
Methyl-B-D-Glucopyranoside	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+	—
Pullulan	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—
D-raffinose	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
O/129 Resistance (comp.vibrio.)	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—
Salicin	+	—	+	—	—	—	—	+	—	+	+	—	+	—	—	+	—
Saccharose/sucrose	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+
D-trehalose	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—
Arginine dihydrolase 2	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—
Optochin resistance	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+

Таблица П.Б-3 – Биохимические свойства грамотрицательных ризобактерий

Субстрат	Номер штамма									
	3	8	15	19	21	31	35	36	37	41
Ala-Phe-Pro-arylamidase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Adonitol	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—
L-pyrrolydonyl arylamidase	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+
L-Arabitol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-Cellobiose	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—
Beta-galactosidase	+	+	—	—	+	+	+	—	+	—
H ₂ S	—		—	—	—	—	—	—	—	—
Beta-N-acetyl-glucosaminidase	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamyl arylamidase pNA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-glucose	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
Gamma-glutamyl-transferase	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—
Fermentation/glucose	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+
Beta-glucosidase	—	+	—	—	+	+	—	+	—	+
D-maltose	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—
D-mannitol	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+
Beta-xylosidase	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—
Beta-alanine arylamidase pNA	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
L-proline arylamidase	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
Lipase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Palatinose	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—
Tyrosine arylamidase	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Urease	—		—	—	+	+	—	—	—	—
D-sorbitol	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Saccharose/sucrose	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы П.Б-3

Субстрат	Номер штамма									
	3	8	15	19	21	31	35	36	37	41
D-tagatose	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Growth in 6.5% NaCl		—	+	+	—	+	—	—	—	—
D-trehalose	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Citrate (sodium)	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—
Malonate	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
5-keto-D-gluconate	+	—	—	—	+	+	+	—	+	—
L-Lactate alkalisation	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Alpha-glucosidase	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Succinate alkalisation	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
Beta-N-acetyl-galactosaminidase	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—
Alpha-galactosidase	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—
Phosphatase	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
Glycine arylamidase	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Ornithine decarboxylase	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Lysine decarboxylase	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
L-histidine assimilation	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
Coumarate	+	—	+	—	—	—	+	+	+	+
Beta-glucoronidase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O/129 resistance (comp. vibrio)	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—
Glu-Gly-Arg-arylamidase	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-malate assimilation	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
ELLMAN	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-Lactate assimilation	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—

ПРИЛОЖЕНИЕ В**Справки о национальном патентном депонировании ризобактерий**

Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Форма ВКПМ-ВР/4

14700

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ**СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ**

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Bacillus thuringiensis BF-26

Дата депонирования: 05 августа 2024 года

Депозитор: Серазетдинова Юлия Ренатовна

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
продуцент индол-3-уксусной кислоты

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14700

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Форма ВКПМ-ВР/4

14701

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Bacillus subtilis BF-29

Дата депонирования: 05 августа 2024 года

Депозитор: Серазетдинова Юлия Ренатовна

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
продуцент гиббереллиновой кислоты

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14701

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1,г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Форма ВКПМ-ВР/4

14725

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Raoultella ornithinolytica BF-31

Дата депонирования: 05 августа 2024 года

Депозитор: Серазетдинова Юлия Ренатовна

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
продуцент индол-3-уксусной кислоты

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14725

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Форма ВКПМ-ВР/4

14726

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Pantoea agglomerans BF-35

Дата депонирования: 05 августа 2024 года

Депозитор: Серазетдинова Юлия Ренатовна

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
продуцент индол-3-уксусной кислоты

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14726

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.



Биоресурсный центр Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ)
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



1117545, 1-й Дорожный проезд д.1, г. Москва mail:vkpm@genetika.ru тел. (495) 315 12 10

Форма ВКПМ-ВР/4

14727

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Биоресурсный Центр - Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Pantoea vagans BF-36

Дата депонирования: 05 августа 2024 года

Депозитор: Серазетдинова Юлия Ренатовна

Область применения штамма (продукт, продуцируемый штаммом):
продуцент индол-3-уксусной кислоты

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-14727

Руководитель БРЦ ВКПМ
д.б.н., проф.



Синеокий С.П.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г**Нормативные документы**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

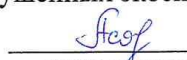
ОКП 92 9170

Группа С05
(ОКС 65.080)**УТВЕРЖДАЮ**Проректор по научно-инновационной
работе ФГБОУ ВО «КемГУ» Жидкова Е.А.

15» 10 2024 г.

Биопрепарат «БП-010» (вводится впервые)**Технические условия
ТУ 20.20.19-294-02068309-2024**Дата введения в действие – 15.10.2024**РАЗРАБОТАНО**Младший научный сотрудник лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ
личная подпись

Фотина Н.В.

Заведующий лабораторией фиторемедиации
техногенно нарушенных экосистем, д.т.н., доцент
личная подпись

Асякина Л.К.

Кемерово 2024 г.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

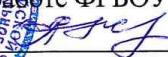
ОКП 92 9170

Группа С05
(ОКС 65.080)



УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-инновационной
работе ФГБОУ ВО «КемГУ»

 Жидкова Е.А.

«15» 10 2024 г.

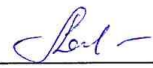
Биопрепарат «БП-010» (вводится впервые)

Технологическая инструкция
ТИ ТУ 20.20.19-294-02068309-2024

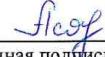
Дата введения в действие – 15.10.2024

РАЗРАБОТАНО

Младший научный сотрудник лаборатории
фиторемедиации техногенно нарушенных
экосистем НИУ

 Фотина Н.В.
личная подпись

Заведующий лабораторией фиторемедиации
техногенно нарушенных экосистем, д.т.н., доцент

 Асякина Л.К.
личная подпись

Кемерово 2024 г.