

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

*На правах рукописи*

**Серазетдинова Юлия Ренатовна**

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИХ  
РИЗОБАКТЕРИЙ И РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТА КОМПЛЕКСНОГО  
ДЕЙСТВИЯ НА ИХ ОСНОВЕ**

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

|                                                                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>                                                                                              | <b>4</b>   |
| <b>ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....</b>                                                                            | <b>10</b>  |
| 1.1 Микробные биопрепараты сельскохозяйственного назначения в системе биоэкономики и биологизации земледелия..... | 10         |
| 1.2 Механизмы взаимодействия ростостимулирующих ризобактерий с растениями.....                                    | 14         |
| 1.3 Биоконтрольный потенциал ростостимулирующих ризобактерий.....                                                 | 18         |
| 1.4 Микробиологические подходы к оптимизации минерального питания растений.....                                   | 31         |
| 1.5 Заключение по литературному обзору.....                                                                       | 39         |
| <b>ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>                                         | <b>41</b>  |
| 2.1 Организация выполнения работы и схема эксперимента.....                                                       | 41         |
| 2.2 Объекты исследования.....                                                                                     | 43         |
| 2.3 Используемые материалы, реактивы и оборудование.....                                                          | 46         |
| 2.4 Методы исследования.....                                                                                      | 51         |
| 2.5 Заключение по главе 2.....                                                                                    | 67         |
| <b>ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ.....</b>                                                                     | <b>68</b>  |
| 3.1 Изучение культурально-морфологических свойств штаммов..                                                       | 68         |
| 3.2 Изучение биотехнологических характеристик штаммов.....                                                        | 76         |
| 3.3 Заключение по главе 3.....                                                                                    | 102        |
| <b>ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСОРЦИУМОВ РИЗОБАКТЕРИЙ.....</b>                                                        | <b>104</b> |
| 4.1 Конструирование микробных консорциумов.....                                                                   | 104        |
| 4.2 Лабораторная апробация микробных консорциумов.....                                                            | 112        |
| 4.3 Заключение по главе 4.....                                                                                    | 126        |

|                                                            |                     |                     |                    |            |
|------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------|
| <b>ГЛАВА 5</b>                                             | <b>ИССЛЕДОВАНИЕ</b> | <b>ГЕНЕТИЧЕСКИХ</b> | <b>СВОЙСТВ</b>     |            |
| <b>ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ.....</b>                          |                     |                     |                    | <b>128</b> |
| 5.1 Сборка геномов.....                                    |                     |                     |                    | 128        |
| 5.2 Транскриптомные исследования.....                      |                     |                     |                    | 134        |
| 5.3 Сопоставление                                          | фенотипических,     | геномных            | и                  |            |
| транскриптомных данных.....                                |                     |                     |                    | 153        |
| 5.4 Заключение по главе 5.....                             |                     |                     |                    | 159        |
| <b>ГЛАВА 6</b>                                             | <b>ПРАКТИЧЕСКАЯ</b> | <b>РЕАЛИЗАЦИЯ</b>   | <b>РЕЗУЛЬТАТОВ</b> |            |
| <b>ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>                                   |                     |                     |                    | <b>160</b> |
| 6.1 Подбор параметров культивирования биопрепарата.....    |                     |                     |                    | 160        |
| 6.2 Подбор рациональных доз внесения биопрепарата.....     |                     |                     |                    | 166        |
| 6.3 Оценка безопасности и срока годности биопрепарата..... |                     |                     |                    | 169        |
| 6.4 Экономическая оценка разработанного биопрепарата.....  |                     |                     |                    | 173        |
| 6.5 Заключение по главе 6.....                             |                     |                     |                    | 179        |
| <b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....</b>                            |                     |                     |                    | <b>181</b> |
| <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>                 |                     |                     |                    | <b>183</b> |
| <b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>                                     |                     |                     |                    | <b>222</b> |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Рост численности населения и изменение структуры потребления обуславливают устойчивое увеличение спроса сельскохозяйственную продукцию. По данным организации объединенных наций, численность населения мира в 2050 г. приблизится к 9,7 млрд человек, что увеличит мировой спрос на продовольствие на 50–60 %.

Традиционное повышение объемов производства сельскохозяйственной продукции за счет применения минеральных удобрений и химических средств защиты растений характеризуется существенными экологическими ограничениями, такими как загрязнение почвенных и водных ресурсов, накопление нитратов и остаточных пестицидов в продуктах питания.

В этих условиях возрастает значение биологизации земледелия как направления, позволяющего повысить продуктивность полевых культур при сохранении экологической устойчивости агроэкосистем. Данный вектор соответствует приоритетам государственной политики Российской Федерации, отраженным в национальных проектах «Технологическое обеспечение продовольственной безопасности» и «Технологическое обеспечение биозкономики», а также Федеральному закону от 03.08.2018 № 280-ФЗ «Об органической продукции ...», закрепляющему правовые условия перехода к органическому сельскому хозяйству.

Перспективным инструментом биологизации являются экологически безопасные биопрепараты на основе ростостимулирующих бактерий – продукты биотехнологического синтеза, получаемые с использованием технологий микроорганизмов-продуцентов. Такие препараты способны улучшать питание растений за счет фиксации атмосферного азота, мобилизации труднодоступных форм фосфора и калия, синтеза фитогормонов, сидерофоров и других биологически активных соединений. Разработка подобных средств соответствует природоподобным

подходам к созданию агротехнологий, основанным на использовании естественных механизмов взаимодействия микроорганизмов и растений.

**Степень разработанности темы.** Существенный вклад в развитие инновационных технологий в области создания биопрепаратов для сельского хозяйства внесли отечественные и зарубежные исследователи: И. А. Тихонович, А. А. Завалин, Н. А. Проворов, М. В. Безрукова, В. С. Шевелуха, Е. П. Трепачев, Т. К. Шешегова, Л. В. Кравченко, А. П. Кожемяков, О. Н. Кулаева, И. В. Бойкова, И. В. Максимов, Р. М. Хайруллин, В. К. Чеботарь, U. Mathesius, S. Wienkoop, I. Pertot, S. Sarrocco, D. Spadaro и др.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках:

- государственного задания по теме «Исследование потенциала ростостимулирующих бактерий для повышения агрономической биофортификации пшеницы» (шифр FZSR-2024-0009, приложение А);

- студенческого стартапа программы фонда содействия инновациям (III очередь) по теме «Разработка технологии производства биоудобрений на основе RGP-ризобактерий для повышения производительности и пищевой ценности сельскохозяйственных культур» (№ 1205ГССС15-L/88213, приложение Б).

**Цели и задачи работы.** Целью диссертационного исследования является научное обоснование и экспериментальная разработка биотехнологических параметров получения биопрепарата комплексного действия на основе консорциума ростостимулирующих ризобактерий и оценка его влияния на рост и развитие яровой мягкой пшеницы.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- провести скрининг штаммов отечественных коллекций микроорганизмов по комплексу биотехнологически ценных свойств: способности к накоплению общего азота; продуцированию аммиака, фитогормонов, сидерофоров, АЦК-деаминазы; солюбилизации фосфатов и цинка, образованию биопленок, а также антагонистической активности в отношении фитопатогенов;

- на основании экспериментальных данных о биологической совместимости и функциональных свойствах штаммов сконструировать микробные консорциумы и исследовать их влияние на показатели развития яровой мягкой пшеницы;
- изучить молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие ростостимулирующую и биотехнологическую активность штаммов консорциума;
- подобрать параметры культивирования биопрепарата, обеспечивающие накопление микробной биомассы и сохранение его функциональной активности; оценить показатели качества и безопасности разработанного биопрепарата;
- оценить экономическую целесообразность производства биопрепарата.

**Научная новизна работы.** Впервые на основе комплексного скрининга штаммов Национального биоресурсного центра Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» по восьми биотехнологически значимым признакам (продуцирование фитогормонов, сидерофоров, солюбилизация фосфатов и цинка, образование биопленок, потенциально способствующих устойчивой колонизации корневой поверхности растений, антагонистическое действие в отношении фитопатогенов) научно обоснован состав микробного консорциума для биопрепарата комплексного действия. Впервые методами геномного и транскриптомного анализа раскрыты молекулярно-генетические механизмы ростостимулирующей активности штаммов *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis*, включая гены биосинтеза фитогормонов и сидерофоров, что позволило обосновать их функциональную совместимость в составе консорциума. Установлены новые экспериментальные закономерности влияния разработанного биопрепарата на морфометрические и физиолого-биохимические показатели яровой мягкой пшеницы сортов Сибирский Альянс, Памяти Афродиты, Надежда Кузбасса.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость заключается в расширении научных представлений о функциональной роли ростостимулирующих ризобактерий как продуцентов биологически активных веществ, а также в обосновании молекулярно-генетических механизмов,

определяющих их биотехнологический потенциал для создания препаратов комплексного действия.

Практическая значимость работы состоит в следующем. Научно обоснован и экспериментально подтвержден отбор перспективных штаммов ростостимулирующих ризобактерий для разработки биопрепарата. Выявлены генетические и транскриптомные особенности, связанные с энергетическим метаболизмом, стрессоустойчивостью, биосинтезом аминокислот, кофакторов и фитогормонов у перспективных штаммов. Сконструирован и апробирован биопрепарат на основе консорциума *Priestia aryabhatai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis*. Подобраны биотехнологические параметры культивирования, обеспечивающие высокий выход микробной биомассы и сохранение функциональной активности препарата. Разработана техническая документация, проведена оценка экономической эффективности производства биопрепарата.

**Методология и методы исследования.** При выполнении работы использовались общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований, включающие: микробиологические культурально-зависимые методы оценки морфологических и биохимических свойств штаммов; количественные спектрофотометрические методы; молекулярно-генетические методы, биотехнологические методы культивирования; методы лабораторной апробации для оценки эффективности биопрепарата.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- научно обоснованная концепция создания биопрепарата комплексного действия на основе скрининга биотехнологически ценных свойств штаммов (способность к продуцированию аммиака, фитогормонов, сидерофоров, солюбилизации фосфатов и цинка, образованию биопленок, антагонистической активности в отношении фитопатогенов);

- результаты скрининга биотехнологически ценных свойств 15 штаммов из отечественных коллекций; молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие ростостимулирующую активность перспективных штаммов;

– состав консорциума и параметры культивирования биопрепарата на основе *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis*, обеспечивающие высокий выход биомассы и сохранение функциональной активности.

**Степень достоверности и апробации результатов.** Достоверность полученных данных подтверждалась достаточным количеством наблюдений (3–5-кратной повторностью), применением стандартных и общепринятых методов исследования и математической обработки. Основные положения и результаты исследований диссертационной работы являлись предметом докладов и обсуждений на мероприятиях различного уровня: Международной научно-практической конференции «Современные аспекты производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (Краснодар, 2025 г.), Инновационном конвенте «Кузбасс: образование, наука, инновации» (Кемерово, 2024–2025 гг.), Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2024 г.) и др.

Разработки удостоены следующих наград: работа признана перспективной на молодежной премии в области науки и техники «Надежда России» Российского союза научных и инженерных общественных объединений (2025 г.); отмечена дипломом I степени XIII Инновационного конвента «Кузбасс: образование, наука, инновации» (2025 г.); диплом I степени за победу в Международном конкурсе научно-исследовательских проектов молодежи «Продовольственная безопасность» в номинации «Лучший инновационный проект» (2025 г.); дипломом Правительства Кузбасса за 1-ое место в конкурсе «Лучший аспирант 2024 года» в номинации «Естественные науки»; дипломом III степени за победу в Международном конкурсе научно-исследовательских проектов молодежи «Продовольственная безопасность» XIV Евразийского экономического форума молодежи в номинации «Лучшее технологическое исследование» (2024 г.); являлась победителем конкурса «Студенческий стартап (очередь III) / Н5 Биотехнологии», договор 1205ГССС15-L/88213.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликованы 24 печатные работы, из них: 8 статей в рецензируемых изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и цитирования Scopus и Web of Science; 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК; 2 патента.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует пп. 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, шести глав, заключения, списка используемой литературы (307 наименований), 4 приложений. Основной текст изложен на 231 странице, содержит 44 таблицы, 66 рисунков.

## ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Глава посвящена обсуждению вопросов, связанных с повышением пищевой и биологической ценности полевых культур, в частности пшеницы, как фактора продовольственной безопасности, с перспективами применения микроорганизмов для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Рассмотрены перспективные для агропромышленного комплекса ростостимулирующие свойства (фиксация атмосферного азота, солюбилизация труднорастворимых элементов, синтез сидерофоров).

### **1.1 Микробные биопрепараты сельскохозяйственного назначения в системе биоэкономики и биологизации земледелия**

В современных условиях развитие агропромышленного сектора определяется необходимостью одновременно обеспечивать продовольственную безопасность и снижать антропогенную нагрузку на окружающую среду. Традиционная модель интенсивного сельского хозяйства, основанная на широком применении минеральных удобрений и химических средств защиты растений, сопровождается деградацией почв, истощением водных ресурсов, снижением биоразнообразия и нарушением экосистемных функций [43, 107, 149, 176, 202, 205, 227].

Сельское хозяйство также вносит существенный вклад в глобальные климатические процессы: аграрный сектор является одним из значимых источников антропогенных выбросов парниковых газов, формируемых преимущественно животноводством и применением азотных удобрений [180, 210]. В связи с этим повышение эффективности агропромышленного производства требует внедрения более устойчивых технологических подходов.

Одним из таких направлений является развитие биоэкономики, основанной на рациональном использовании возобновляемых биологических ресурсов и формировании ресурсосберегающих производственных цепочек [150, 200, 294, 296]. В Российской Федерации данное направление реализуется, в том числе, в рамках национального проекта «Технологическое обеспечение биоэкономики», ориентированного на развитие высокотехнологичных производств и внедрение биотехнологических решений [51]. Для агропромышленного комплекса это связано с возможностью повышения продуктивности при одновременном снижении химической нагрузки на агроэкосистемы [72].

Значимым дополнением выступает национальный проект «Технологическое обеспечение продовольственной безопасности», стратегической целью которого является комплексное развитие отечественного агропромышленного комплекса [52]. Данная инициатива направлена на укрепление конкурентных позиций российского агропромышленного комплекса как на внутреннем, так и на международном рынках посредством инфраструктурной модернизации (в частности, создания агропромышленных технопарков), а также на обеспечение предприятий современным отечественным оборудованием. Кроме того, биоэкономическая трансформация агропромышленного сектора связана не только с экологизацией производства, но и с достижением технологического суверенитета, развитием отечественных биопрепаратов и снижением зависимости от импортных агрохимикатов [89].

Одним из ключевых направлений биоэкономической трансформации сельского хозяйства является биологизация земледелия, предполагающая более широкое использование естественных механизмов регуляции агроэкосистем, включая микробиологическую активность почвы, симбиотические взаимодействия, биологические средства защиты растений и микробные препараты [11, 80]. К основным инструментам биологизации относятся биоудобрения и биофунгициды [126].

Биоудобрения содержат живые микроорганизмы или продукты их метаболизма, способные улучшать минеральное питание растений, мобилизовать

элементы питания и синтезировать биологически активные соединения [30, 125, 216, 223]. Биофунгициды, в свою очередь, направлены на ограничение развития фитопатогенных микроорганизмов за счёт конкуренции, синтеза антибиотических соединений, микопаразитизма, продукции литических ферментов и индукции системной устойчивости растений [124, 129, 130, 131, 154, 160, 174, 288].

Использование биоудобрений и биофунгицидов имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными химическими препаратами [60]. К их числу относятся снижение количества остаточных пестицидов в продукции, уменьшение риска загрязнения почвы и водных объектов, снижение негативного воздействия на нецелевые организмы, возможность применения в органическом земледелии, а также возможность включения в системы интегрированной защиты растений [106, 133]. Кроме того, биопрепараты позволяют снижать риск формирования резистентности у фитопатогенов, поскольку их действие основано на комплексе биологических механизмов, а не на одном химическом активном веществе [212, 250].

Вместе с тем широкое внедрение биофунгицидов и биоудобрений в агропромышленную практику ограничивается рядом факторов. Во-первых, эффективность биопрепаратов в значительной степени зависит от почвенно-климатических условий, влажности, температуры, кислотности почвы, агрофона и состояния микробиома конкретного агроценоза [113, 214, 215]. В отличие от химических средств защиты растений, действие биопрепаратов может проявляться медленнее и быть менее предсказуемым при неблагоприятных условиях внешней среды [41, 58, 104]. Существенной проблемой остается ограниченный срок хранения ряда препаратов, чувствительность живых культур к транспортировке и необходимость соблюдения специальных условий хранения [276].

Распространению биопрепаратов препятствуют недостаточная информированность сельхозпроизводителей, дефицит практических рекомендаций по применению, а также недоверие к результативности биологических средств в сравнении с привычными химическими препаратами [267].

Дополнительными барьерами являются высокая стоимость разработки и регистрации новых биопрепаратов [94, 251], сложность стандартизации их

качества, недостаточная развитость системы демонстрационных испытаний и слабая интеграция научных разработок с запросами агробизнеса [276]. Высокий титр жизнеспособных клеток не гарантирует сохранения способности микроорганизмов продуцировать фитогормоны, сидерофоры, мобилизовать элементы питания и подавлять фитопатогены. Особенно сложно обеспечить стандартизацию многокомпонентных препаратов, поскольку в процессе культивирования и хранения может изменяться соотношение входящих в них штаммов. В связи с этим качество микробного препарата должно оцениваться не только по численности клеток, но также по стабильности его состава и сохранению функциональной активности [81, 249, 251, 276]. В российской практике данные проблемы усиливаются необходимостью импортозамещения в сфере штаммовых коллекций, ферментационного оборудования, питательных сред, средств контроля качества и технологий промышленного масштабирования [28, 82, 218]. Поэтому развитие рынка биопрепаратов требует не только научных исследований, но и формирования устойчивой производственно-технологической инфраструктуры.

Преодоление указанных ограничений возможно при условии комплексного подхода [91, 103, 275]. Необходимы селекция и паспортизация высокоэффективных штаммов микроорганизмов, разработка устойчивых препаративных форм, повышение стабильности биопрепаратов при хранении, создание консорциумов микроорганизмов с комплементарными функциями, а также использование молекулярно-биологических методов для оценки их безопасности и эффективности [81, 157, 249]. Особое значение имеет адаптация биопрепаратов к конкретным почвенно-климатическим зонам и культурам, поскольку универсальные решения в биологической защите и питании растений часто оказываются менее результативными, чем регионально ориентированные технологии [14].

Таким образом, актуальной научно-технологической задачей является разработка комплексного подхода, объединяющего отбор функционально активных штаммов, оценку их совместимости, подтверждение механизмов действия и подбор условий, обеспечивающих сохранение биотехнологически значимых свойств при производстве и хранении препарата.

## **1.2 Механизмы взаимодействия ростостимулирующих ризобактерий с растениями**

Перспективными агентами для разработки биопрепаратов сельскохозяйственного назначения являются микроорганизмы, способные вступать в функционально значимые взаимодействия с растениями и направленно изменять процессы, происходящие в ризосфере [191, 204]. В отличие от химических средств, действие которых, как правило, ограничено внесением определённого соединения, микроорганизмы представляют собой живые биологические системы, обладающие метаболической активностью, способностью адаптироваться к стрессовым факторам, колонизировать корневую зону, а также реализовывать комплекс ростостимулирующих и защитных механизмов [110, 114, 172, 256]. Благодаря этому они могут не только временно изменять доступность отдельных элементов питания, но и участвовать в регуляции растительно-микробных взаимодействий, влияющих на рост, развитие и устойчивость полевых культур [3, 269].

Взаимодействие ростостимулирующих бактерий с растением представляет собой многоуровневую систему, формирующуюся в ризосфере, ризоплане, а также во внутренних тканях корня (рисунок 1.2.1) [65, 67, 102]. Ризосфера является высокоактивной микробиологической зоной, в которой корневые экссудаты растений выполняют функцию трофического субстрата и хемотаксического сигнала для ассоциированных бактерий [16, 37, 84, 85, 92]. В ответ ризобактерии реализуют комплекс физиолого-биохимических механизмов, направленных на усиление минерального питания, регулирование гормонального статуса, повышение стрессоустойчивости и поддержание фитосанитарного состояния растения [23, 25, 47, 65].

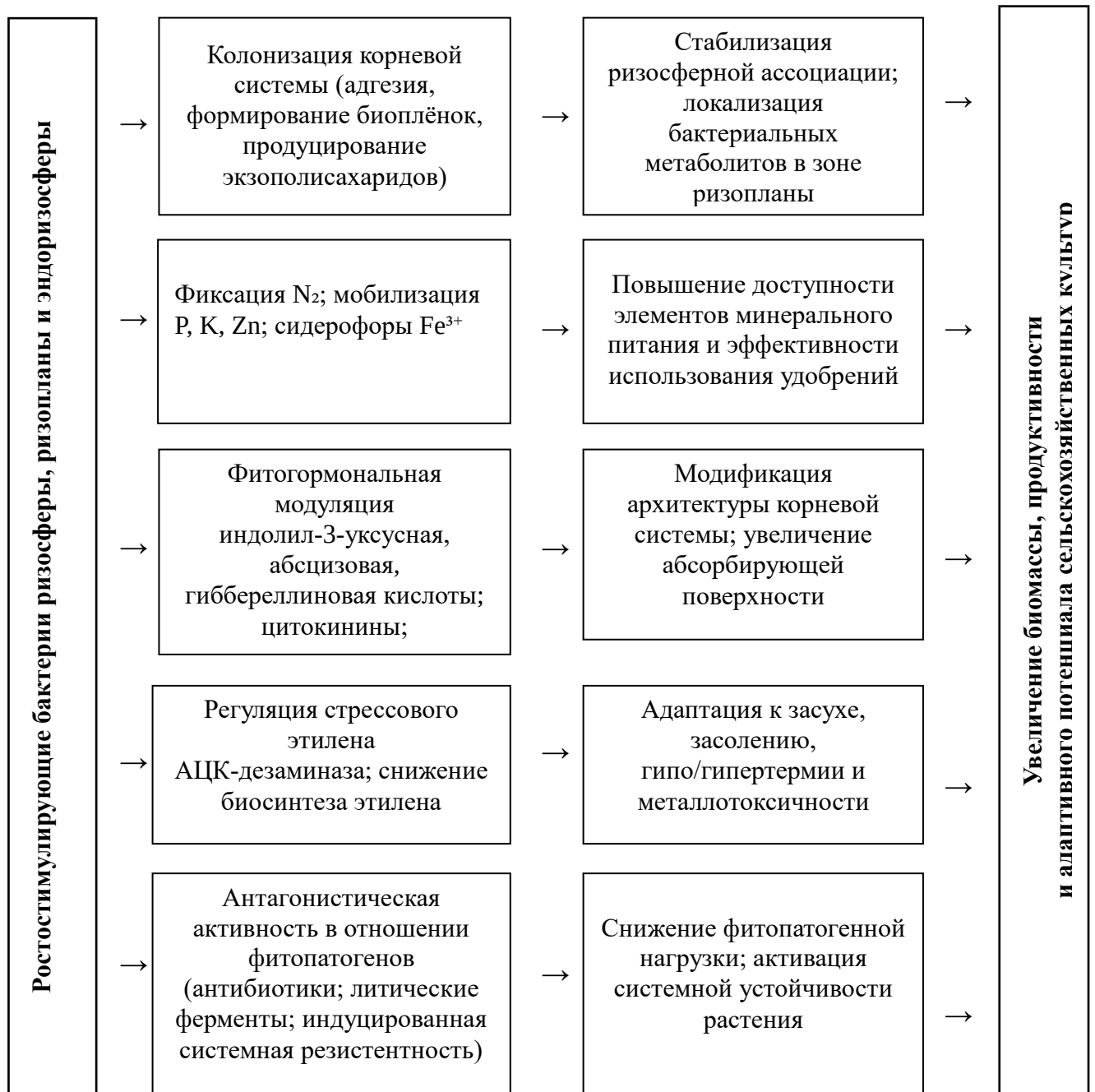


Рисунок 1.2.1 – Концептуальная схема взаимодействия ростостимулирующих ризобактерий с растениями

Одним из центральных направлений положительного влияния ризобактерий является оптимизация минерального питания растений [17]. Данная группа механизмов включает фиксацию атмосферного азота, растворение труднодоступных соединений, синтез сидерофоров, обеспечивающих хелатирование и транспорт железа [2, 20, 33]. В результате повышается доступность элементов питания в ризосфере,

возрастает эффективность их поглощения корневой системой, что имеет особое значение для полевых культур в условиях интенсивного земледелия.

Ризобактерии также участвуют в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессам посредством синтеза экзополисахаридов, осмопротекторов, летучих органических соединений, а также через усиление антиоксидантных ферментных систем растения [19, 20, 56, 280, 288]. В результате снижается уровень окислительного повреждения, стабилизируется водный режим, поддерживается ионный гомеостаз и сохраняется фотосинтетическая активность [40, 41]. В условиях засухи и засоления данные механизмы способствуют поддержанию тургора, снижению повреждения мембранных структур и сохранению продукционного процесса [45, 68].

Косвенное ростостимулирующее действие ризобактерий связано с ограничением развития фитопатогенов и индуцированием системной устойчивости растения [4, 5, 29, 99]. Синтез сидерофоров, антибиотических соединений, гидролитических ферментов, цианогенных и летучих метаболитов обеспечивает конкурентное подавление фитопатогенной микрофлоры [86]. Одновременно отдельные бактериальные метаболиты способны индуцировать защитные сигнальные пути растения, что приводит к формированию иммунного ответа [21, 22]. В этом случае ростостимулирующий эффект формируется не только за счёт прямого влияния на питание и морфогенез, но и вследствие снижения инфекционной нагрузки и уменьшения затрат растения на развитие патологического процесса, повышения супрессивности почвы [59, 71].

Агрономический эффект взаимодействия ризобактерий с растением выражается в увеличении длины и массы корневой системы, повышении биомассы надземных органов, усилении фотосинтетической активности, улучшении водного и минерального статуса, повышении устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам, а также в потенциальном увеличении урожайности. Вместе с тем эффективность ризобактериальной инокуляции определяется не только наличием у штамма отдельных ростостимулирующих признаков, но и его способностью к устойчивой колонизации корня,

совместимостью с генотипом растения, адаптацией к почвенно-климатическим условиям и взаимодействием с нативным микробиомом агроценоза [63].

В то же время наличие у микроорганизма отдельного ростостимулирующего признака характеризует его потенциальные возможности, но не позволяет однозначно прогнозировать эффект на растении. Продуцирование метаболитов зависит от состава среды, доступности предшественников, плотности клеточной популяции и условий культивирования. Кроме того, положительное действие микроорганизма возможно только при его выживании, закреплении на корневой поверхности и сохранении метаболической активности в присутствии нативной микробиоты. Поэтому выраженность культуральных признаков и эффективность инокуляции растений могут не совпадать [16, 48, 144, 215, 256].

Аналогичные ограничения характерны для молекулярно-генетического прогнозирования. Наличие гена или биосинтетического кластера свидетельствует о потенциальной способности микроорганизма, но не подтверждает его экспрессию и образование функционально значимого продукта. В то же время один и тот же фенотипический эффект может формироваться несколькими метаболическими путями. В связи с этим достоверная характеристика ростостимулирующего потенциала требует сопоставления геномных, транскриптомных, культуральных и растительных данных [195, 247, 286, 293].

Таким образом, ростостимулирующее действие ризобактерий формируется за счёт совокупности трофических, гормональных, защитных и стресс-протекторных механизмов и зависит от условий взаимодействия микроорганизма с растением. При этом отдельные культуральные или генетические признаки не позволяют однозначно прогнозировать эффект, что обосновывает необходимость комплексного сопоставления фенотипических, геномных и транскриптомных данных.

### 1.3 Биоконтрольный потенциал ростостимулирующих ризобактерий

Ризобактерии, ассоциированные с корневой системой растений, рассматриваются как важный компонент биологической защиты полевых культур, поскольку они способны одновременно стимулировать рост и ограничивать развитие фитопатогенных грибов, бактерий, оомицетов [13, 46]. Защитный эффект формируется за счет совокупности прямых и опосредованных механизмов: антагонизма и антибиоза, продукции литических ферментов, конкуренции за элементы питания и экологические ниши, образования сидерофоров, летучих органических соединений, а также индукции системной устойчивости растений [8, 12, 50, 64, 101]. В отличие от химических фунгицидов и бактерицидов, действие ризобактерий часто носит многофакторный характер, что снижает вероятность быстрого формирования устойчивости у фитопатогенов и делает такие микроорганизмы перспективными агентами экологически ориентированного земледелия [35, 53].

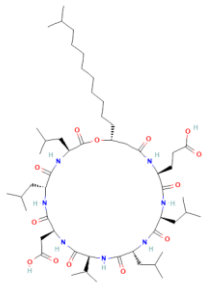
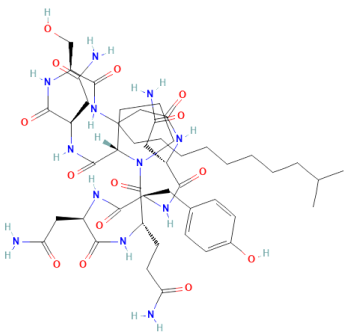
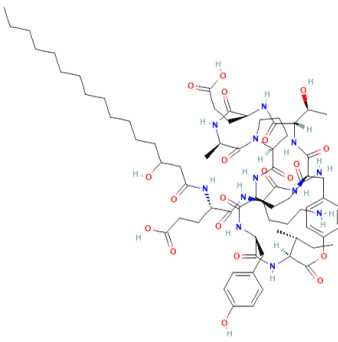
Микробные ферменты, также называемые ферментами, разрушающими клеточные стенки, такие как целлюлазы, хитиназы, глюканазы, липазы, пектиназы и протеазы, привлекли внимание благодаря своему ингибированию фитопатогенов [9, 77, 78, 173]. Они также играют важную роль в круговороте питательных веществ в экосистеме, разлагая органическое вещество. Эти ферменты разрушают структурный компонент клеточной стенки грибов и, таким образом, ингибируют прорастание спор и удлинение ростковых трубок [224]. Egamberdieva и др. [120] выделили бактериальные эндофиты из хрена (*Armoracia rusticana* G.Gaertn), и они продемонстрировали активность некоторых литических ферментов, таких как липаза, протеаза, хитиназа и глюканаза. Было показано, что большинство бактериальных штаммов подавляют патогены растений, такие как *Fusarium culmorum*, *F. solani* и *Rhizoctonia solani* [75]. Результаты, полученные Ву и др. [289], подчеркивают деградацию клеточной стенки грибкового патогена с помощью  $\beta$ -1,3-глюканаз, хитиназы, целлюлазы и протеаз.

Одним из ключевых механизмов биоконтроля является синтез низкомолекулярных антимикробных метаболитов [115]. Наиболее изученными продуцентами таких соединений являются представители родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, а также симбиотические ризобии, включая *Rhizobium* и *Sinorhizobium/Ensifer* [6, 42, 70, 88, 95, 143]. Указанные бактерии способны подавлять рост мицелия, прорастание спор, образование биопленок, подвижность клеток фитопатогенов и экспрессию факторов вирулентности. Особенно важным является то, что многие метаболиты обладают не только прямой токсичностью в отношении патогенов, но и способностью изменять микробные взаимодействия в ризосфере, усиливать конкурентоспособность полезных бактерий и инициировать защитные реакции растения [74].

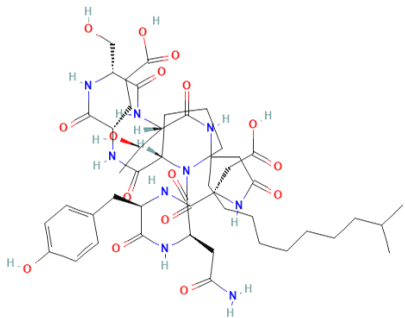
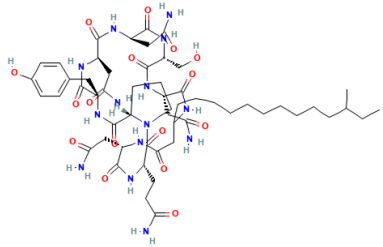
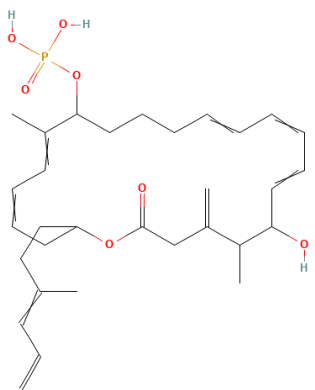
Среди антимикробных веществ ризобактерий особое место занимают циклические липопептиды, характерные прежде всего для *Bacillus* и *Pseudomonas* [24]. У *Bacillus* наиболее значимыми являются сурфактины, итурины, фенгицины, бацилломицины и микосубтилины (таблица 1.3.1) [31, 32, 61]. Эти соединения проявляют выраженную антифунгальную активность за счет взаимодействия с мембранами грибов, нарушения их проницаемости, образования пор, утечки внутриклеточных компонентов и подавления роста гиф [3]. Сурфактины, кроме прямого мембранного действия, участвуют в колонизации поверхности корня, формировании биопленок и индукции системной устойчивости растений [87].

У *Pseudomonas* аналогичную роль выполняют циклические липопептиды, включая орфамиды, массетолиты и вискозин-подобные соединения, которые подавляют зооспоры оомицетов и фитопатогенные грибы [10, 76]. Антимикробные метаболиты бактерий рода *Bacillus* представлены в таблице 1.3.1

Таблица 1.3.1 – Антимикробные метаболиты бактерий рода *Bacillus*

| Продуцент                                                                           | В-во      | Структура                                                                            | Механизм действия                                                                                                                                                                                                                                                     | Ссылка          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> ,<br><i>B. velezensis</i> ,<br><i>B. amyloliquefaciens</i> | Сурфактин |     | Встраивается в мембраны, повышает проницаемость, нарушает ионный баланс; усиливает подвижность/колонизацию <i>Bacillus</i> инициирует индуцированную системную устойчивость растений. Эффективен в отношении <i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Botrytis</i> . | [198, 273]      |
| <i>B. velezensis</i> ,<br><i>B. subtilis</i> ,<br><i>B. siamensis</i>               | Игурин А  |   | Разрушает клеточные мембраны грибов и бактерий, взаимодействуя с липидными компонентами, что приводит к лизису клеток.                                                                                                                                                | [118, 139, 140] |
| <i>B. subtilis</i> ,<br><i>B. velezensis</i> ,<br><i>B. amyloliquefaciens</i>       | Фенгицин  |  | Взаимодействует с липидными доменами грибной мембраны, вызывает морфологические деформации гиф, лизис клеток. Индуцирует системную резистентность растений.                                                                                                           | [154, 178, 232] |

Продолжение таблицы 1.3.1

| Продуцент                                             | В-во           | Структура                                                                            | Механизм действия                                                                                                                                     | Ссылка          |
|-------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>B. amyloliquefaciens</i> ,<br><i>B. velezensis</i> | Бацилломицин D |    | Нарушает мембраны, снижает жизнеспособность конидий, повреждает гифы; описан как перспективный агент против <i>F. graminearum</i> .                   | [136]           |
| <i>B. subtilis</i>                                    | Микосубтилин   |    | Связывается с мембранами грибов, формирует поры, вызывает утечку внутриклеточного содержимого; активен против широкого спектра фитопатогенных грибов. | [115, 196]      |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> ,<br><i>B. velezensis</i> | Диффицидин     |  | Влияет на экспрессию генов вирулентности, деления клетки и клеточной стенки.                                                                          | [123, 285, 301] |

Важную группу составляют поликетидные, фенольные и гетероциклические антибиотические вещества. У *Pseudomonas* к наиболее изученным соединениям относятся 2,4-диацетилфлороглюцинол, пиолотеорин, пирролнитрин, феназин-1-карбоновая кислота и феназин-1-карбоксамид. Эти вещества проявляют активность против широкого спектра фитопатогенов, включая представителей родов *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Pythium*, *Phytophthora* и бактериальных патогенов растений [119, 188, 279, 286]. Их действие связано с нарушением дыхания, генерацией активных форм кислорода, повреждением мембран, ингибированием роста мицелия и подавлением развития инфекционных структур [217, 228, 302]. У *Bacillus* существенную роль играют поликетиды и пептидные антибиотики, такие как диффицидин, бациллаен, макролактин и бациллизин, обладающие преимущественно антибактериальным действием и способные подавлять фитопатогенные бактерии *Xanthomonas*, *Erwinia* и др. [70, 79, 247].

Отдельную функциональную группу образуют сидерофоры – низкомолекулярные хелаторы железа, обеспечивающие бактериям преимущество в условиях ограниченной доступности  $Fe^{3+}$  в ризосфере [7, 26, 90, 168]. К ним относятся пиовердин, пиохелин, бациллибактин, энтеробактин, орнибактин, ризобактин и вицибактин [34, 55]. В отличие от классических антибиотиков, сидерофоры не всегда оказывают прямое токсическое действие на патоген, однако ограничивают его рост за счет конкуренции за железо, необходимое для дыхания, ферментативной активности и др. [36, 38]. Данный механизм особенно важен в ризосфере, где доступность железа ограничена, а конкуренция между микроорганизмами выражена особенно сильно [18].

Существенный вклад в биологический контроль фитопатогенов вносят летучие органические соединения ризобактерий [15]. К ним относятся цианистый водород, ацетоин, 2,3-бутандиол, диметилдисульфид, бензотиазол, кетоны и другие низкомолекулярные соединения. Их действие связано с ингибированием дыхания, нарушением мембранных процессов и снижением жизнеспособности фитопатогенов [146, 152, 153].

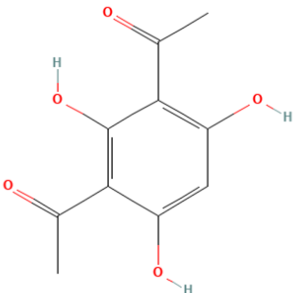
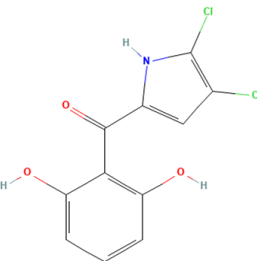
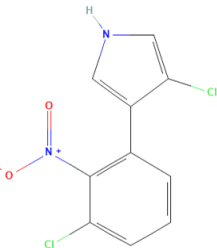
Индукцированная устойчивость является перспективным инструментом в ингибировании инфекционных заболеваний растений в контексте устойчивого сельского хозяйства [173, 204]. Большинство эндофитных микроорганизмов обладают способностью защищать растение-хозяина от фитопатогенов с помощью двух распространенных механизмов: индуцированной системной резистентности и системной приобретенной устойчивости [156, 182]. Индуцированная системная резистентность повышает устойчивость растения-хозяина к патогенам за счет активации связанных с патогенами белков (ПР), полифенолов и фитоалексинов или индукции сигнальных путей, запускаемых жасминовой и салициловой кислотами или этиленом [192].

ПР-белки снижают воздействие патогенов на растения и упрощают защиту от патогенов, стимулируя биотические стрессоры. К ПР-белкам относятся такие ферменты, как хитиназы и 1,3-глюканазы. Эти ферменты играют решающую роль в лизисе вторгшихся грибковых клеток и привлечении линий клеточной стенки для сопротивления инфекции и гибели клеток [158]. Например, *P. polymyxa* вызывала индуцированную системную резистентность у перца в отношении возбудителя бактериальной пятнистости *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* [17].

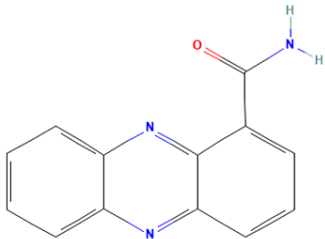
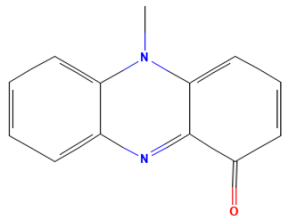
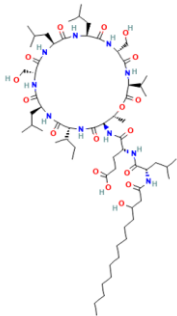
*Pseudomonas aeruginosa* демонстрировала способность к биологическому контролю *Fusarium oxysporum* sp. *pisi* путем индуцирования системной резистентности в зараженных растениях гороха и путем усиления активности антиоксидантных ферментов, таких как пероксидаза, полифенолоксидаза, аскорбатоксидаза, каталаза и общее содержание фенолов [186].

Антимикробные метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*, их структура и механизм действия, представлены в таблице 1.3.2.

Таблица 1.3.2 – Антимикробные метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*

| Продуцент                                                                                              | В-во                      | Структура                                                                           | Механизм действия                                                                                                                                                                          | Ссылка          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> ,<br><i>P. protegens</i>                                                | 2,4-диацетилфлороглюцинол |    | Поликетидный антибиотик широкого спектра; подавляет прорастание спор и рост мицелия, нарушает мембранные/митохондриальные процессы и развитие патогенов                                    | [188]           |
| <i>Pseudomonas protegens</i>                                                                           | Пиолютеорин               |   | Хлорированный поликетид-пиррольный антибиотик; угнетает рост грибов, оомицетов и некоторых бактерий, нарушает развитие гиф/колоний                                                         | [243]           |
| <i>Pseudomonas protegens</i> ,<br><i>P. chlororaphis</i> ,<br><i>Burkholderia</i> ,<br><i>Serratia</i> | Пирролнитрин              |  | Хлорированный пиррольный антибиотик; подавляет дыхание, прорастание спор и рост мицелия грибов; важен против <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> и других фитопатогенов | [221, 244, 245] |

Продолжение таблицы 1.3.2

| Продуцент                                   | В-во                            | Структура                                                                           | Механизм действия                                                                                                                                                                                                               | Ссылка |
|---------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <i>Pseudomonas</i> ,<br><i>Burkholderia</i> | Феназин-1-карбоновая<br>кислота |    | Вызывает окислительный стресс и подавление фитопатогенных грибов/бактерий; производные обычно активнее исходного феназина. Связан с контролем болезней, вызываемых <i>Fusarium</i> , <i>Gaeumannomyces</i> , <i>Rhizoctonia</i> | [229]  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>               | Пиоцианин                       |    | Вызывает окислительный стресс и нарушение энергетического обмена у фитопатогенов                                                                                                                                                | [293]  |
| <i>Pseudomonas protegens</i>                | Орфамид А                       |  | Циклический липопептид. Нарушает целостность мембраны, подавляет зооспоры оомицетов; также индуцирует системную резистентность у растений                                                                                       | [305]  |

Ризобии, включая *Rhizobium* и *Sinorhizobium/Ensifer*, традиционно рассматриваются прежде всего как симбиотические азотфиксирующие бактерии бобовых культур, однако современные исследования показывают их высокий потенциал в качестве агентов биологического контроля [93, 108]. Их антагонистическое действие может быть связано с микопаразитизмом, продуцированием сидерофоров, HCN, аммиака, летучих метилкетонов, жирнокислотных производных, бактериоциноподобных веществ и сигнальных молекул, способных активировать системную устойчивость растения [145, 240]. Сообщалось, что ризобии паразитируют, деформируют и подавляют гифы и репродуктивные структуры грибов, а также противодействуют грибным патогенам путем секреции гидролитических ферментов. Так, Kumar и др. [300] сообщили, что *Sinorhizobium fredii* KCC5 и *Pseudomonas fluorescens* LPK2 способны продуцировать  $\beta$ -1,3-глюканазу и хитиназу, что вызывает ингибирование роста *Fusarium udum*.

Цианистый водород (HCN) – это вторичный метаболит, продуцируемый многими микроорганизмами, и это летучее соединение, известное своей антимикробной ролью и подавлением заболеваний. В сочетании с глицином (основным предшественником HCN) фермент HCN-синтетаза образует HCN. Последний, скорее всего, действует как ингибитор переноса электронов, что в конечном итоге приводит к подавлению цепочки поставок энергии и, следовательно, влияет на рост микроорганизмов [194].

Способность продуцировать HCN обнаружена у ряда штаммов ризобий, в частности в работе Sumathy и соавторов [271], около 37,5 % изолятов ризобий обладали способностью продуцировать данный метаболит. Штаммы *Ensifer meliloti* RM и SINO также демонстрировали способность продуцировать HCN [169].

Исследования сообщают о способности индуцировать системную устойчивость растений с помощью видов ризобий, таких как *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* и *R. leguminosarum* bv. *trifolii* [233]. Díaz-Valle и др. [151] изучали инокуляцию фасоли обыкновенной штаммом *Rhizobium etli*,

который стимулировал устойчивость растений к инфекции *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* посредством активации генов, связанных с защитой. Elbadry и др. [193] инокулировали бобы (*Vicia faba* L.) бактериями *Pseudomonas fluorescens* FB11 и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FBG05 для изучения индукции системной устойчивости к вирусу желтой мозаики бобов.

Ряд штаммов *Sinorhizobium*, *Rhizobium* и родственных таксонов способен синтезировать вторичные метаболиты, участвующие в подавлении фитопатогенных микроорганизмов [163]. К таким соединениям относятся сидерофоры, антибиотические вещества и летучие органические соединения, влияющие на рост, подвижность, биоплёнообразование и способность патогенов колонизировать корневую поверхность [165, 187, 238].

Одним из ключевых механизмов биологического контроля является сидерофор-опосредованная конкуренция за железо. Для *Sinorhizobium meliloti* 1021 описан синтез ризобактина – гидроксаматного сидерофора, способного эффективно связывать  $\text{Fe}^{3+}$  [281, 287]. Наличие такого механизма особенно важно в условиях конкуренции с фитопатогенными микроорганизмами, поскольку дефицит доступного железа нарушает их метаболическую активность, снижает скорость роста и может ограничивать формирование инфекционных структур [295]. Таким образом, ризобактин может рассматриваться как один из факторов, опосредующих антагонистический потенциал *S. meliloti* 1021 в ризосфере.

Аналогичный механизм характерен и для других представителей ризобий. Так, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* продуцирует вицибактин – циклический тригидроксаматный сидерофор, обеспечивающий хелатирование  $\text{Fe}^{3+}$  [284]. За счёт связывания железа вицибактин способствует формированию железодефицитных условий для конкурирующих микроорганизмов, включая фитопатогенные бактерии и грибы. У *Rhizobium leguminosarum* также описан шизокинен – гидроксаматный сидерофор, функционально связанный с ограничением доступности железа в ризосфере [208].

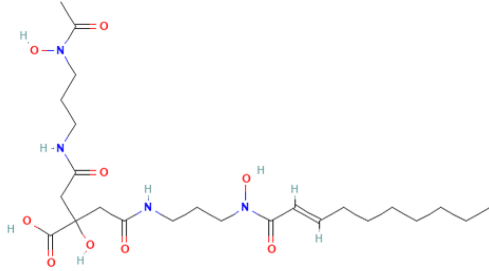
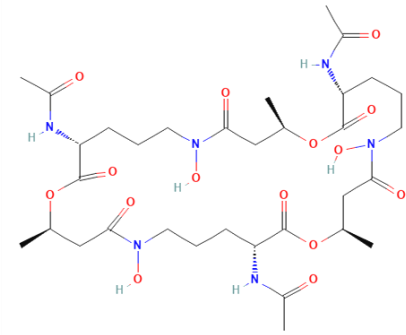
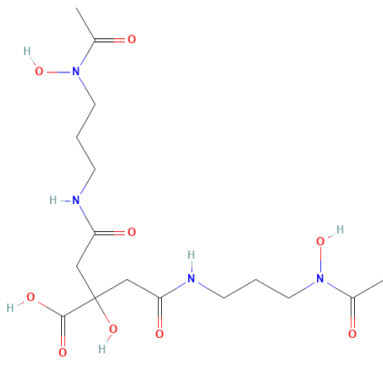
Помимо конкуренции за железо, ризобии могут подавлять микроорганизмы за счёт синтеза антибиотических соединений. Примером является трифолитоксин,

продуцируемый *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24 [159]. Это рибосомально синтезируемый и посттрансляционно модифицируемый пептидный антибиотик, активный преимущественно в отношении  $\alpha$ -протеобактерий [237]. Его биологическое значение заключается в подавлении чувствительных бактериальных конкурентов в ризосферной нише, что может повышать конкурентоспособность продуцента и косвенно способствовать защите растения от биотического стресса [282].

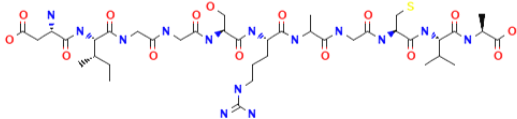
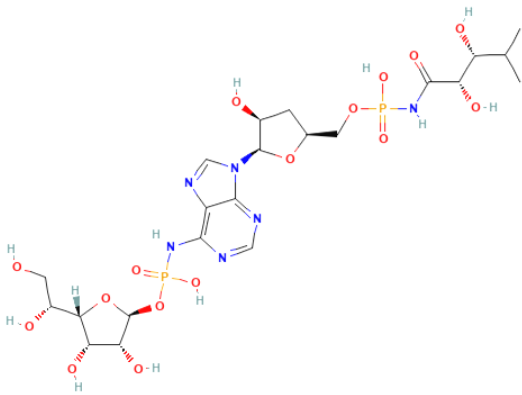
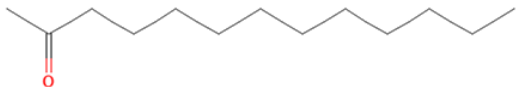
Другим хорошо изученным примером является агроцин 84, продуцируемый штаммом *Rhizobium radiobacter/rhizogenes* K84 [199]. Данное соединение представляет собой высокоспецифичный антибиотический фактор, активный против чувствительных агробактерий. Агроцин 84 проникает в клетки-мишени через системы транспорта опинов, после чего его токсическая часть ингибирует лейцил-тРНК-синтетазу. Нарушение функции данного фермента приводит к блокированию синтеза белка и подавлению роста клетки-мишени [171, 303]. Таким образом, ризобии способны реализовывать не только неспецифическую конкуренцию за ресурсы, но и высокоспециализированное антибиотическое воздействие на родственные фитопатогенные бактерии.

Отдельное значение имеют летучие органические соединения, способные изменять поведение фитопатогенов без непосредственного контакта с клетками продуцента. Для *Sinorhizobium meliloti* описана продукция 2-тридеканона – летучего соединения, влияющего на подвижность и способность микроорганизмов к формированию биоплёнок [105, 189]. Снижение подвижности, а также способности формировать биоплёнки ослабляет колонизационную способность патогенов, ограничивает их закрепление на корневой поверхности и уменьшает вероятность формирования устойчивых микробных сообществ, связанных с инфекционным процессом [127]. В отличие от сидерофоров, действие 2-тридеканона связано не столько с трофической конкуренцией, сколько с нарушением поведенческих и колонизационных характеристик микроорганизмов [242]. Антимикробные метаболиты ризобий представлены в таблице 1.3.3.

Таблица 1.3.3 – Антимикробные метаболиты ризобий

| Продуцент                                        | Вещество   | Структура                                                                            | Механизм действия                                                                                                                                                  | Ссылка     |
|--------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021               | Ризобактин |    | Гидроксаматный сидерофор: связывает $\text{Fe}^{3+}$ , снижает доступность железа для фитопатогенных грибов и бактерий, тем самым ограничивает их рост в ризосфере | [264]      |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> | Вицибактин |    | Циклический тригидроксаматный сидерофор: хелатирование $\text{Fe}^{3+}$ и железodefицитное подавление фитопатогенов                                                | [253]      |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i>                   | Шизокинен  |  | Гидроксаматный сидерофор: ограничивает фитопатогены через дефицит доступного железа                                                                                | [181, 203] |

Продолжение таблицы 1.3.3

| Продуцент                                               | Вещество      | Структура                                                                            | Механизм действия                                                                                                                                                    | Ссылка |
|---------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> T24  | Трифолитоксин |    | Рибосомально синтезируемый и посттрансляционно модифицируемый пептидный антибиотик, активный против $\alpha$ -протеобактерий                                         | [237]  |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> /<br><i>rhizogenes</i> K84 | Агроцин 84    |    | Проникает в клетки через системы транспорта опинов, затем токсическая часть ингибирует лейцил-транспортно-рибонуклеиновокислотную синтетазу и блокирует синтез белка | [122]  |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i>                           | 2-тридеканон  |  | Снижает подвижность и способность образовывать биопленки, что снижает колонизирующую способность корня                                                               | [252]  |

Таким образом, антимикробные вещества ризобактерий представляют собой химически и функционально разнородную группу соединений, включающую липопептиды, поликетиды, феназины, пиррольные антибиотики, сидерофоры, летучие органические соединения, бактериоцины, жирнокислотные производные и элиситорные молекулы. Их биологическая роль не ограничивается прямым подавлением фитопатогенов: многие из этих метаболитов одновременно участвуют в микробной конкуренции, формировании ризосферного микробиома, колонизации корня и запуске системной устойчивости растений.

#### **1.4 Микробиологические подходы к оптимизации минерального питания растений**

Азот (N) – это важный макроэлемент, играющий решающую роль в различных физиологических и биохимических процессах, связанных с ростом и развитием растений. Он составляет основу жизненно важных биомолекул, таких как ДНК, белки, аминокислоты, хлорофилл и фитогормоны [97, 183]. Растения поглощают N из питательных растворов в форме  $\text{NO}_3^-$  и аммония ( $\text{NH}_4^+$ ). При определенных условиях растения поглощают органические соединения  $\text{N}_2$ , такие как аминокислоты, пептиды и мочевины, особенно когда они в большом количестве присутствуют в корневой зоне или при определенных физиологических или стрессовых условиях [27, 219].  $\text{NO}_3^-$  является предпочтительной формой из-за его высокой подвижности в питательных растворах, низкой фитотоксичности и совместимости с насыщенными кислородом корневыми системами [65, 83, 230].

Биологическая фиксация атмосферного азота – это ферментативный процесс, в котором diaзотрофные микроорганизмы превращают  $\text{N}_2$  в  $\text{NH}_4^+$ , обеспечивая растения биодоступным азотом для клеточного метаболизма, синтеза белка и

накопления биомассы [62, 98, 283]. Согласно другому исследованию, микробиота ежегодно осуществляет фиксацию 200 млн т азота во всем мире [62, 225].

Процесс биологической азотфиксации, заключающийся в преобразовании атмосферного  $N_2$  в аммоний ( $NH_4^+$ ), представляет собой каскад ферментативных реакций [207, 231]: трансформацию  $N_2$  до аммиака (азотфиксация), ассимиляцию аммиака в органические формы азота и последующее его превращение в аммонийные соли [278]. При этом процесс фиксации азота наиболее изучен для ризобий (род *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* и *Sinorhizobium*). В результате этого симбиоза образуются специальные органы – корневые клубеньки, где происходит фиксация атмосферного азота с участием нитрогеназного комплекса [49, 190], состоящего из динитрогеназы и динитрогеназоредуктазы [49, 134]. Динитрогеназа, кодируемая генами *nifD* и *nifK*, является молибдензависимым ферментом, а динитрогеназоредуктаза представляет собой гомодимер продукта гена *nifH* [1, 49, 138]. В природе существует три типа динитрогеназы, различающиеся по металлу в активном центре: молибден-, ванадий- и железосодержащая. Молибденнитрогеназа является универсальной для всех diaзотрофов, тогда как ванадий- и железонитрогеназы обнаруживаются лишь у некоторых видов [49, 141].

Симбиотическое взаимодействие бобовых растений и ризобий инициируется обменом молекулярными сигналами, регулируемым сложным каскадом генов. Флавоноиды (флаван, 7,4-дигидроксифлаван, изофлаван, генистеин и др.), выделяемые растениями [48, 49], индуцируют у ризосферных бактерий синтез Nod-факторов, запускающий процессы корневого клубенькообразования [1, 49], сопровождающиеся делением кортикальных и перициклических клеток и колонизацией бактериями. В процессе созревания клубеньков бактерии заключаются в перибактероидную мембрану, создающую микроаэробные условия, необходимые для дифференциации бактерий в бактериоиды и осуществления ими фиксации атмосферного азота [49, 66].

Хотя симбиотическая азотфиксация наиболее характерна для бобовых растений, аналогичные процессы, не сопровождающиеся образованием

клубеньков, могут происходить и у небобовых растений в симбиозе с различными diaзотрофами [44]. Исследование механизмов формирования симбиотических ассоциаций между растениями и микроорганизмами открывает перспективы для расширения практического применения биологической фиксации азота на небобовые культуры [222].

Микроорганизмы существенно влияют на обеспечение растений биологически доступным железом. В условиях дефицита этого элемента они продуцируют сидерофоры – низкомолекулярные соединения, связывающие ионы  $Fe^{3+}$  [54]. Образующиеся комплексы железо-сидерофор затем транспортируются в клетку с помощью специфических механизмов, различающихся у грамположительных и грамотрицательных бактерий [111]. У грамположительных бактерий этот процесс включает сидерофорсвязывающие белки, пермеазы и АТФазы, а у грамотрицательных – рецептор наружной мембраны, периплазматический связывающий белок и ABC-транспортер. Внутри клетки железо восстанавливается до  $Fe^{2+}$ , высвобождается из комплекса, благодаря чему становится доступным для транспортных систем растений [195]. Данный процесс характерен для различных микроорганизмов, в том числе представителей Rhizobiaceae, как в симбиозе с бобовыми, так и с небобовыми растениями [49, 263].

Сидерофоры не единственные хелатирующие агенты, продуцируемые микроорганизмами. В современной научной литературе присутствуют сведения и о других веществах, способствующих повышению биодоступности различных металлов. Whiting и др. [49, 297] указали на способность многих бактерий синтезировать цинк-хелатирующие металлофоры, повышающие концентрацию водорастворимого цинка в почве. Mastropasqua и др. [49, 184] экспериментально подтвердили способность *Pseudomonas aeruginosa* продуцировать металлофор, участвующий в поглощении цинка клетками. S. Lhospice и др. [49, 241] предположили, что псевдолиновый металлофор играет ключевую роль в поглощении цинка из хелатированной среды.

Микроорганизмы, способствующие накоплению железа в растениях, представлены в таблице 1.4.1.

Таблица 1.4.1 – Микроорганизмы, способствующие накоплению железа в растениях

| Наименование микроорганизма                                                                                                                                       | Культура             | Повышение содержания железа, % | Источник |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------|----------|
| <i>Bacillus subtilis</i> ZM63,<br><i>Bacillus aryabhattai</i> ZM31                                                                                                | Кукуруза             | 78                             | [307]    |
| <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ,<br><i>Bembidion antiquum</i> , <i>Enterobacter ludwigii</i> , <i>Acinetobacter tandoii</i> ,<br><i>Pseudomonas monteilii</i> | Нут, голубиный горох | 12–18                          | [235]    |
| <i>Bacillus aryabhattai</i><br>MDSR 14                                                                                                                            | Соя                  | 36                             | [234]    |
| Арбускулярная микориза                                                                                                                                            | Нут                  | 5                              | [226]    |
| <i>Enterobacter cloacae</i> subsp.<br><i>dissolvens</i> MDSR9                                                                                                     | Соя                  | 25                             | [234]    |
| Флуоресцентные штаммы<br><i>Pseudomonas</i>                                                                                                                       | Нут                  | 81                             | [128]    |
| <i>Bacillus mojavensis</i> и <i>Bacillus cereus</i>                                                                                                               | Сорго                | 97                             | [142]    |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                                                                                                                                | Картофель            | 18                             | [213]    |
| <i>Bacillus simplex</i>                                                                                                                                           | Картофель            | 31                             |          |

Хелаторы формируют растворимые комплексы с  $Zn^{2+}$ , снижая взаимодействие ионов цинка с почвенными компонентами. Whiting et al. [304] установили значительное влияние бактериально продуцируемых металлофоров, выделяемых бактериями *Microbacterium saperdae*, *Pseudomonas monteilii* и *Enterobacter cancerogenes*, на биодоступность Zn в почве и поглощение корнями растений. Tariq et al. [236] также сообщили, что биоинокулянты *Azospirillum lipoferum* (JCM-1270, ER-20), *Pseudomonas* sp. (96-51) и *Agrobacterium* sp. (Ca-18) способствуют растворению гидроксида и фосфата цинка, увеличивая доступность цинка для риса за счет продукции природных хелатирующих агентов. Обнаружено, что это опосредовано выработкой природных хелатирующих агентов [236]. Согласно исследованиям Kusey [201], обработка растений *Penicillium bilaji* увеличила растворимость и поглощение Zn растениями в большей степени в сравнении с применением механизмов хелатирования этилендиаминтетраацетата.

Микробная мобилизация цинка осуществляется не только посредством хелатирования, но и за счёт продуцирования органических кислот и экструзии протонов [49, 236]. Выделение органических кислот приводит к снижению pH

ризосферы и, как следствие, увеличивает растворимость неорганических соединений цинка. Ключевую роль в этом процессе играют глюконовая и кетоглюконовая кислоты [49, 272], продуцируемые разнообразными бактериальными видами (таблица 1.4.2).

Таблица 1.4.2 – Микроорганизмы, синтезирующие органические кислоты

| Наименование микроорганизма             | Органическая кислота                            | Источник |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------|
| <i>Bacillus megaterium</i>              | глюконовая                                      | [197]    |
| <i>Lysinibacillus</i> sp.               | глюконовая                                      |          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | 2-кетоглюконовая                                | [262]    |
| <i>Burkholderia</i> sp.                 | глюконовая                                      | [164]    |
| <i>Pseudomonas chlororaphis</i>         | глюконовая, малоновая, щавелевая                | [190]    |
| <i>Streptomyces narbonensis</i>         | Лимонная, яблочная, 2-оксоглутаровая, янтарная  |          |
| <i>Curtobacterium oenoscedimentum</i>   | Лимонная, малоновая, 2-оксоглутаровая, янтарная | [166]    |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | 5-кетоглюконовая                                | [258]    |
| <i>Bacillus altitudinis</i>             | гексановая, пентановая, миндальная              | [167]    |

В то же время, солюбилизация сопряжена и с синтезом других органических кислот, таких как лимонная, яблочная, щавелевая, винная, муравьиная и уксусная [49, 258]. Исследование, проведённое Kushwaha и соавторами, демонстрирует способность *Bacillus altitudinis* к солюбилизации трёх различных форм цинка ( $ZnO$ ,  $Zn_3(PO_4)_2$ ,  $ZnCO_3$ ). Этот процесс связан с биосинтезом гексановой, пентановой и миндальной кислот [49, 167]. Хотя неорганические кислоты (например, серная, азотная и угольная) также способствуют растворению соединений цинка, их эффективность значительно ниже в сравнении с органическими кислотами, что указывает на преобладающую роль микробного синтеза органических кислот в мобилизации цинка в ризосфере [49].

Микроорганизмы способствуют усилению поглощения и накопления цинка растениями, что проявляется в виде его аккумуляции в зерне и бобах. Например, благодаря синтезу органических кислот штамм *Enterobacter cloacae* MDSR9 обуславливает более интенсивное поглощение и накопление цинка в соевых бобах [49, 234].

Доступность фосфора для растений существенно повышается благодаря активности микроорганизмов [69, 255]. Фосфат-солюбилизирующие микроорганизмы осуществляют трансформацию фосфора посредством минерализации, солюбилизации и иммобилизации, эффективность которых зависит от количества неорганических фосфатов в почве. Стратегии солюбилизации фосфатов микроорганизмами включают: синтез органических кислот, сидерофоров, экзогенных ферментов, протонов, а также минерализацию органического вещества [49, 73, 96].

Сообщается, что среди метаболитов микроорганизмов в растворении фосфатов участвуют неорганические кислоты (соляная, серная, азотная, угольная и др. кислоты), однако их эффективность значительно ниже в сравнении с органическими кислотами. За счет синтеза неорганических кислот (азотная и серная) солюбилизируют фосфор представители рода *Nitrobacter* и *Thiobacillus* [49, 262]. Ацидофильные и сероокисляющие бактерии способствуют высвобождению фосфора из фосфатов железа благодаря выделению сероводорода при разложении органических веществ, а также сульфатного восстановления [49, 161]. Например, сероокисляющий штамм *Delftia* sp. SR4 в аэробных условиях за 7 дней окислял 20 мМ тиосульфата и 1 г/дм<sup>3</sup> элементарной серы до 220 и 203 мг/дм<sup>3</sup> сульфата соответственно. При инокуляции *Brassica juncea* этим штаммом наблюдали увеличение усвоения фосфора на 116 % по сравнению с необработанными растениями [49, 257].

Альтернативным механизмом солюбилизации фосфора микроорганизмами является протонная экструзия [49, 138]. В культуральной жидкости *Pseudomonas* sp. наблюдалось растворение фосфатов без образования органических кислот, что связывают с протонной экструзией [49, 179]. Микроорганизмы ассимилируют аммоний, присутствующий в почве, для синтеза аминокислот. Затем внутри клетки аммоний превращается в аммиак с высвобождением избыточного протона  $H^+$  в цитоплазму. За счет этого происходит закисление среды, окружающей клетку, и растворение нерастворимых форм фосфатов [49, 179]. Sharan и Darmwal [261] показали, что при использовании  $NH_4^+$  в качестве источника азота растворимость

фосфора вокруг микробной клетки выше, чем при использовании  $\text{NO}_3^-$ . Однако такой механизм характерен для ограниченного числа микроорганизмов [225].

Трансформация фосфора микроорганизмами включает в себя, помимо ранее описанных механизмов, ферментативный гидролиз органических фосфатов. Этот процесс осуществляется кислыми и щелочными фосфатазами [225], при этом щелочные фосфатазы играют доминирующую роль, катализируя гидролиз приблизительно 90 % органического фосфора почвы, делая его доступным для растений [137]. Внесение в почву очищенных щелочных фосфатаз, полученных из *Bacillus licheniformis* MTCC 2312, приводило к увеличению концентрации фосфора в корнях и стеблях *Zea mays* L. в 2,35 и 1,76 раза [49, 266]. Другие исследования показали, что синергетическое действие фосфатсольбилизирующего микроскопического гриба *Talaromyces helices* L7B и арбускулярно-микоризного гриба *Rhizophagus irregularis* значительно повысило активность щелочной фосфатазы в почве (с 47,86 до 459,38 МЕ) и увеличило содержание доступного фосфора на 50 % по сравнению с контролем [148].

Другой важный аспект микробной трансформации фосфора – деградация фитатов, органических соединений фосфора, недоступных для прямого усвоения растениями под действием ферментов [49, 225]. Это имеет важное значение для повышения доступности фосфора, так как растения не способны усваивать фитаты. Исследования показали, что внедрение генов микроорганизмов, ответственных за секретирование фитазы, в растение способствует лучшему усвоению фосфора. Например, ген *phyA* из *Aspergillus niger* значительно улучшил фосфорное питание *Arabidopsis* [49, 255].

Биодоступность селена регулируется микроорганизмами через окислительно-восстановительные реакции и метилирование. Различные микроорганизмы, такие как *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* и т.д., демонстрируют способность увеличивать доступность селена для растений [220]. Так, Trivedi и др. [290] отмечают способность *Paraburkholderia megapolitana*, *Alcaligenes faecalis* и *Stenotropomonas maltophilia* увеличивать содержание биологически доступного селена в почвах. Синергитический эффект в накоплении селена достигается совместным

использованием ростостимулирующих бактерий и микоризных грибов. Так, применение консорциума, включающего селенобактерии и гриб *G. Claroideum*, привело к увеличению концентрации селена в зерне на 23,5 % относительно необработанных вариантов. Эффективность совместного применения может быть обусловлена питанием селенобактерий от гиф микоризных грибов [49, 162]. Диссимиляционное восстановление селенита до элементарного селена — доминирующий путь микробной трансформации этого элемента. *Thaurea selenatis*, анаэробная  $\beta$ -протеобактерия, использующая селенат в качестве терминального акцептора электронов, является примером микроорганизма, преобразующего селенат в наноселен [49, 132].

Некоторые виды бактерий и грибов, обнаруженные в почве, играют жизненно важную роль в преобразовании Se между различными валентными состояниями. Среди них процесс восстановления, облегчаемый специфическими редуктазами, включая нитратредуктазы, респираторные селенатредуктазы и фумаратредуктазы, был широко изучен с целью влияния на биодоступность и подвижность Se в почве [260]. Помимо бактерий, недавно также изучался потенциал грибковых видов в преобразовании Se. Замечено, что виды грибов *Pyrenochaeta* sp., *Plectosphaerella cucumerina*, *Paraconiothyrium sporulosum*, *Stagonospora* sp., *Acremonium strictum*, *Stagonospora* sp., *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Mortierella humilis*, *Trichoderma harzianum* и *Phoma glomerata* демонстрировали способность восстанавливать Se до наночастиц селена [109, 177]. Исследования также подтвердили роль селенобактерий, таких как *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Klebsiella* и *Acinetobacter*, в улучшении поглощения Se растениями [259]. Исследования также показывают, что микробы также модулируют экспрессию белков и генов, связанных с поглощением Se в растениях [211].

## 1.5 Заключение по литературному обзору

Анализ научной литературы показывает, что ростостимулирующие ризобактерии обладают значительным потенциалом для повышения продуктивности полевых культур и снижения зависимости сельскохозяйственного производства от минеральных удобрений и химических средств защиты растений. К наиболее изученным механизмам их действия относятся биологическая фиксация азота, мобилизация труднорастворимых соединений фосфора и микроэлементов, синтез фитогормонов, регуляция стрессового этилена, образование сидерофоров, колонизация корневой системы и подавление фитопатогенов. Вместе с тем накопление сведений об отдельных ростостимулирующих признаках пока не привело к созданию универсальных принципов прогнозирования эффективности микробных препаратов.

Одной из основных нерешённых проблем остается ограниченная сопоставимость результатов лабораторного скрининга и фактического действия микроорганизмов на растения. Выраженность ростостимулирующих признаков зависит от состава питательной среды и условий культивирования, тогда как в ризосфере бактерии подвергаются воздействию корневых экссудатов, конкуренции со стороны нативной микробиоты и колебаний доступности питательных веществ. Вследствие этого штаммы, проявляющие высокую активность *in vitro*, не всегда обеспечивают сопоставимый эффект при инокуляции растений [41, 58, 63, 113, 214, 215]. Для уменьшения данной неопределённости возможно использовать поэтапный подход, включающий комплексный скрининг, последующий отбор перспективных микроорганизмов и оценку их влияния на полевые культуры.

Значительные ограничения в рассматриваемой научной сфере связаны с переходом от лабораторного консорциума к стабильному биопрепарату. Условия максимального накопления микробной биомассы не всегда обеспечивают максимальную продукцию фитогормонов, сидерофоров и других функционально

значимых метаболитов. Для многокомпонентных препаратов дополнительно возникает необходимость сохранения жизнеспособности отдельных штаммов и заданного соотношения компонентов. Поэтому качество биопрепарата должно характеризоваться не только общим титром микроорганизмов, но также сохранением ростостимулирующей активности, безопасностью и стабильностью свойств при хранении [81, 249, 251, 276].

Таким образом, центральной нерешённой проблемой рассматриваемой научной сферы является отсутствие комплексной и стандартизированной системы, связывающей результаты первичного скрининга микроорганизмов, их молекулярно-генетический потенциал, экологическую совместимость, активность в составе консорциума, действие на целевую культуру и технологическую стабильность биопрепарата. Решение этой проблемы требует последовательного сочетания культуральных, молекулярно-генетических, биотехнологических и растительных методов исследования.

## **ГЛАВА 2 ОРГАНИЗАЦИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В данной главе рассмотрены объекты и методы исследования, используемые материалы, реактивы и оборудование для изучения эффективности использования ризобактерий в регулировании биотического стресса пшеницы.

### **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, обосновании цели и постановке задач исследования.

Экспериментальная часть работы состояла из трех последовательных этапов. На первом этапе осуществляли отбор и характеристику бактериальных штаммов, обладающих ростостимулирующими свойствами. Для каждого штамма определяли ключевые физиолого-биохимические параметры, свидетельствующие о способности к стимуляции роста растений, в частности: способность к синтезу фитогормонов (индолил-3-уксусная, гиббереллиновая кислоты), способность к накоплению общего азота, мобилизации неорганических соединений фосфора и выработке сидерофоров, синтез АЦК-деаминазы, а также антагонистическую активность штаммов в отношении фитопатогенных микроорганизмов.

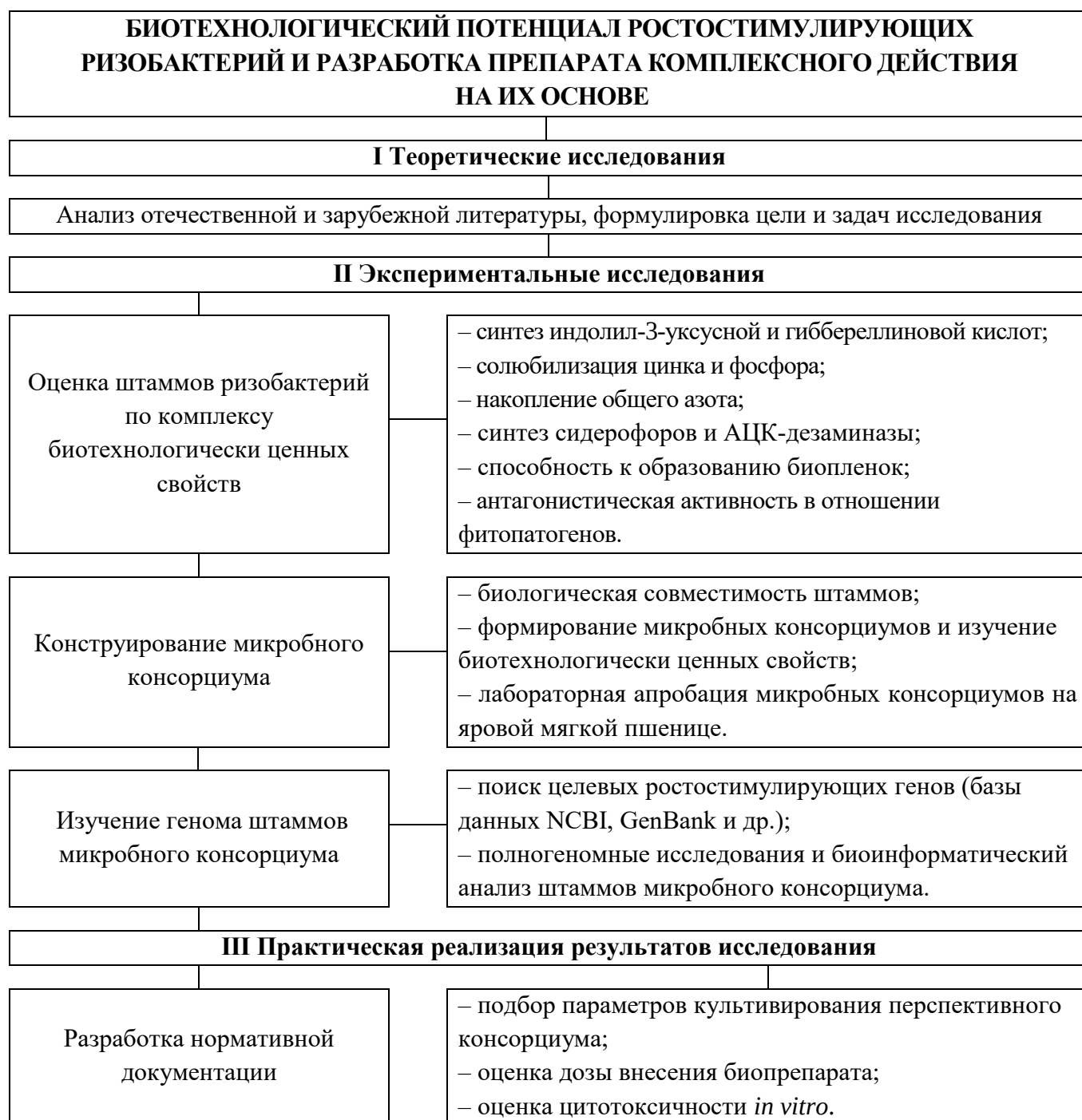


Рисунок 2.1.1 – Схема проведения диссертационного исследования

На втором этапе исследовали биологическую совместимость отобранных штаммов и определяли возможные синергетические эффекты при их совместном культивировании. В сконструированных микробных консорциумах анализировали функциональную активность микроорганизмов. Оценка проводилась по совокупности показателей, включающих интенсивность продуцирования фитогормонов,

накопления общего азота и мобилизации фосфора, а также устойчивость микроорганизмов к антагонистическим воздействиям.

На этапе практической реализации осуществлен подбор параметров культивирования микробного консорциума, обеспечивающих накопление микробной биомассы и сохранение функциональной активности биопрепарата; определена доза внесения биопрепарата; исследована цитотоксичность в условиях *in vitro* для подтверждения безопасности разрабатываемого биопрепарата. Завершающим этапом практической реализации являлась подготовка нормативной документации, необходимой для дальнейшего внедрения разработанного биопрепарата.

При выполнении работы использовались общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований, включающие микробиологические, физиолого-биохимические, молекулярно-генетические и аналитические подходы. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Microsoft Office Excel 2021. Результаты исследования агрономически ценных свойств консорциумов оценивали при помощи анализа ANOVA с апостериорным критерием Шеффе.

## 2.2 Объекты исследования

Объектами исследований являлись:

1. Штаммы Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»:

– *Azospirillum brasilense* B-11094. Штамм выделен из корней росички лежачей (*Digitaria decumbens*), Бразилия. Является типовым штаммом и способен фиксировать атмосферный азот, а также продуцировать полисахариды.

– *Azotobacter chroococcum* B-4148. Штамм получен вследствие спонтанной мутации Rif-r. Способен фиксировать атмосферный азот.

– *Azotobacter chroococcum* B-8739. Штамм выделен из почвы в Московской обл. стационаром «Чашниково» в 2003 г. Скворцовой И.Н. (МГУ, каф. биология почв). Способен фиксировать атмосферный азот.

– *Azotobacter vinelandii* B-932. Штамм способен фиксировать атмосферный азот.

– *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265. Штамм выделен из почвы. Является антагонистом фитопатогенных бактерий и грибов.

– *Bacillus aryabhattai* B-13192.

– *Ensifer meliloti* B-219. Штамм выделен с поверхности корней люцерны, Алма-атинская область, 1961 год. Способен продуцировать нитрагин.

– *Ensifer mexicanus* B-4064. Штамм способен фиксировать атмосферный азот.

– *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062. Штамм способен фиксировать атмосферный азот.

– *Pantoea ananatis* B-5292. Штамм выделен из соломы. Способен защищать растения от заморозков.

– *Pseudomonas koreensis* B-3481. Штамм получен путем мутагенеза. Является антагонистом почвенных патогенов.

– *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802. Штамм выделен из корней авокадо. Способен продуцировать сидерофоры.

– *Rhizobium tropici* B-216. Штамм выделен с поверхности корней конских бобов, Литовская ССР, 1967 г. Способен продуцировать нитрагин.

– *Zygorhiza dagestanica* Y-4318. Штамм выделен из почвы под жимолостью, с. Тарки, Дагестан, Россия. Способен продуцировать фитогормоны.

2. Штамм, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН – обособленного подразделения ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской Академии Наук».

– *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548. Штамм выделен из кукурузы (*Zea mays*).

3. Семена яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

Характеристика используемых сортов яровой мягкой пшеницы представлена ниже.

– сорт «Сибирский Альянс». 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. Среднеустойчив к засухе. Хлебопекарные качества отличные. Сильная пшеница. Умеренно устойчив к пыльной головне; умеренно восприимчив к твердой головне и стеблевой ржавчине; восприимчив к септориозу; сильно восприимчив к мучнистой росе, бурой ржавчине и корневым гнилям. Внешний вид представлен на рисунке 2.2.1 а.



а



б



в



г

Примечание – а – сорт «Сибирский Альянс»; б – сорт «Памяти Афродиты»; в – сорт «Надежда Кузбасса»; г – сорт «Экстра»

Рисунок 2.2.1 – Семена яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

– сорт «Памяти Афродиты» (рисунок 2.2.1 б). Включен в Госреестр по Западно-Сибирскому (10) региону. Масса 1000 зерен – 33–39 г. Средняя урожайность в Западно-Сибирском регионе – 24,9 ц/га, на уровне средних стандартов. Максимальная урожайность 63,6 ц/га. Среднеспелый, вегетационный период 83–95 дней. Устойчивость к полеганию на уровне стандартов. Среднеустойчив к засухе. Хлебопекарные качества хорошие. Ценная пшеница. Умеренно восприимчив к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине; восприимчив к твердой головне и септориозу.

– сорт «Надежда Кузбасса» (рисунок 2.2.1 в). Включен в Госреестр по Западно-Сибирскому (10) региону. Масса 1000 зерен – 33–38 г. Средняя урожайность в Западно-Сибирском регионе – 21,6 ц/га, на уровне средних стандартов. Максимальная урожайность 50,3 ц/га. Среднеспелый, вегетационный период 76–90 дней. Устойчивость к полеганию на уровне стандартов. Среднеустойчив к засухе. Хлебопекарные качества хорошие. Ценная пшеница. Умеренно восприимчив к мучнистой росе и септориозу. Восприимчив к корневым гнилям, твердой головне и бурой ржавчине.

- 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 использовали следующее сырье, химические реактивы и расходные материалы:

- вода дистиллированная ГОСТ 6709-72;
- спирт этиловый ГОСТ 5962–2013 (Россия, «Кемеровская фармацевтическая фабрика»);
- ГМФ-бульон (Россия, «Агат-мед»);
- сухой бульон Лурия–Бертани в модификации Миллера (Индия, «HiMedia Laboratories»);
- ГМФ-агар (Россия, «Агат-мед»);
- картофельно-глюкозный агар (Россия, «ЛенРеактив»);
- питательная среда колумбийский агар с кровью (Россия, «Хеликон»);
- Brain Heart Infusion Broth (Россия, «МилЛаб»);
- Difco M9 Minimal Salts, 5× (Франция, «Le Pont de Claix»);
- агар микробиологический, ГОСТ 17206-96 (Россия, «ЛенРеактив»);
- пептон ферментативный сухой (Россия, «Chem-ех»);
- глюкоза кристаллическая, ГОСТ 975-88 (Россия, «Chem-ех»);
- глюкоза, х.ч., ГОСТ 975-88;
- сахароза, ч.д.а., ГОСТ 5833-75 (Россия, «ЛенРеактив»);
- сахароза, х.ч., ГОСТ 5833-75 (Россия, «Сигма Тек»);
- маннит, ч.д.а., ГОСТ 8321-74 (Россия, «Chem-ех»);
- L-триптофан, ч.д.а. (Россия, «Химмед»);
- карбамид (мочевина), х.ч., ГОСТ 6691-77 (Россия, «Chem-ех»);
- железо (III) хлорид, х.ч., ГОСТ 11159-76 (Россия, «ЛенРеактив»);
- калий хлористый, х.ч., ГОСТ 4568-95 (Россия, «ЛенРеактив»);
- калий фосфорнокислый 1-замещенный, х.ч., ГОСТ 4198-75 (Россия, «Chem-ех»);
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный, х.ч., ГОСТ 4172-76 (Россия, «Chem-ех»);
- кальций фосфорнокислый, ч., ТУ 2621-002-57904307-03 (Россия, «АльфаХим»);
- цинк сернокислый 7-водный, х.ч., ГОСТ 4174-77 (Россия, «Chem-ех»);

- аммоний молибденовокислый 4-водный, ч.д.а., ГОСТ 3765-78 (Россия, «Chem-ex»);
- цинк окись, х.ч., ГОСТ 10262-73 (Россия, «ЛенРеактив»);
- аммоний сернокислый, х.ч., ГОСТ 3769-78 (Россия, «ХимРеактив»);
- железо (II) хлорид, х.ч., ГОСТ 11159-76 (Россия, «ЛенРеактив»);
- железо (II) сернокислое, х.ч., ГОСТ 6981-94 (Россия, «ХимРеактив»);
- железо (II) сернокислое 7-водное, х.ч., ГОСТ 6981-94 (Россия, «ХимРеактив»);
- железо (III) сернокислое, х.ч., ГОСТ 9485-74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- калий железистосинеродистый, х.ч., ГОСТ 4207-75 (Россия, «ЛенРеактив»);
- калий фосфорнокислый 2-замещенный, ч.д.а., ГОСТ 2493-75 (Россия, «Chem-ex»);
- кальций углекислый, х.ч., ГОСТ 4530-76 (Россия, «ХимРеактив»);
- кальций фосфорнокислый 2-замещенный, х.ч., ГОСТ 3204-76 (Россия, «Chem-ex»);
- магний сернокислый, х.ч., ГОСТ 4523-77 (Россия, «Chem-ex»);
- марганец (II) сернокислый, х.ч., ГОСТ 435-77 (Россия, «ХимРеактив»);
- медь сернокислая 5-водная, ч.д.а., ГОСТ 4165-78 (Россия, «ХимБаза»);
- натрий молибденовокислый, х.ч., ГОСТ 10931-74 (Россия, «ХимРеактив»);
- натрий хлористый, х.ч., ГОСТ 4233-77 (Россия, «ЛенРеактив»);
- натрий гипохлорид, х.ч., ГОСТ 11086-76 (Россия, «ХимКомпонент»);
- олово двуххлористое 2-водное, ч., ГОСТ 36-78 (Россия, «ЛенРеактив»);
- цинк уксуснокислый, х.ч., ГОСТ 5823-78 (Россия, «ЛенРеактив»);
- борная кислота, х.ч., ГОСТ 18704-78 (Россия, «ЛенРеактив»);
- гиббереллиновая кислота, х.ч. (Россия, «Диа-М»);
- индолил-3-уксусная кислота, х.ч. (Россия, «Диа-М»);
- кислота серная, х.ч., ГОСТ 4204-77 (Россия, «ХимКомпонент»);
- соляная кислота, х.ч., ГОСТ 3118-77 (Россия, «ХимБаза»);
- хлорная кислота, х.ч., ТУ 6-09-2878-84 (Россия, «ЛенРеактив»);

- 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (свободный радикал DPPH), 95 % (Германия, «Alfa Aesar»);
- реактив Несслера, ч.д.а., ТУ 6-09-2089-77 (Россия, «ЛенРеактив»);
- иммерсионное масло, ч.д.а., ГОСТ 13739-78 (Россия, «ChemExpress»);
- конго красный, ч.д.а., ГОСТ 5552-74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- метиленовый голубой, х.ч., ГОСТ 5801–53 (Россия, «ЛенРеактив»);
- хромазуrol S, ч.д.а., ТУ 6-09-05-1175-82 (Россия, «Chem-ex»);
- ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Соединенные Штаты Америки, «Zymo Research»);
- PureLink RNA Mini Kit (Соединенные Штаты Америки, «Invitrogen»);
- РНКаза А (Соединенные Штаты Америки, «Thermo Scientific»);
- ДНКаза Turbo DNase (Соединенные Штаты Америки, «Thermo Scientific»);
- Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Соединенные Штаты Америки, «Agilent Technologies»);
- RNA 6000 Pico Kit (Соединенные Штаты Америки, «Agilent Technologies»);
- NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (Соединенные Штаты Америки, «New England BioLabs»);
- NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Соединенные Штаты Америки, «New England BioLabs»);
- Barcode Library Preparation Kit (Китай, «Polyseq Biotech»);
- Ligation Barcode Kit (Китай, «Polyseq Biotech»);
- F3 Fast Cartridge (Тайвань, «BiOpti»);
- DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set PE100 (Китай, «MGI Tech»);
- стекло предметное, ГОСТ 9284–75 (Россия, «НВ-Лаб»);
- стаканы химические стеклянные вместимостью 50, 100 и 150 см<sup>3</sup>, ГОСТ 29227–91 (Россия, «ЛенРеактив»);
- колбы конические вместимостью 50, 100, 250 и 500 см<sup>3</sup>, ГОСТ 25336–82 (Россия, «Химмедснаб»);

- колбы мерные вместимостью 25, 50 и 100 см<sup>3</sup>, ГОСТ 1770–74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- цилиндры мерные вместимостью 25, 50, 100 и 250 см<sup>3</sup>, ГОСТ 1770–74 (Россия, «ЛенРеактив»);
- пипетки стеклянные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см<sup>3</sup>, ГОСТ 29227–91 (Россия, «ЛенРеактив»);
- пробирки, ГОСТ 1770–74 (Россия, «ХимЛабПрибор»);
- фальконы вместимостью 15 и 50 см<sup>3</sup> (Россия, «Диа-М»);
- чашки Петри, ГОСТ 25336–82 (Россия, «ХимЛабПрибор»);
- стеклянные воронки, ГОСТ 25336–82 (Россия, «Пять Капель»);
- фильтры бумажные, ТУ 6-09-1678-86 (Россия, «ЛабХимСнаб»);
- шпатель Дригальского (Россия, «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 см<sup>3</sup> (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»);
- персональный мультиканальный биореактор с неинвазивным измерением оптической плотности в реальном режиме времени RTS-8 plus (Латвия, «Biosan»);
- ABI 3130xl Genetic Analyzer (USA, «Applied Biosystems»);
- Qsep100 (Тайвань, «BiOpti»);
- Nanodrop (Соединенные Штаты Америки, «Thermo Scientific»);
- Qubit (Соединенные Штаты Америки, «Invitrogen»);
- Covaris S2 (Соединенные Штаты Америки, «Covaris»);
- MGISEQ-2000 (Китай, «MGI Tech»);
- Polyseq One (Китай, «Polyseq Biotech»);
- Bioanalyzer 2100 (Соединенные Штаты Америки, «Agilent Technologies»).

## **2.4 Методы исследования**

### **2.4.1 Поддержание коллекции ризобактерий**

В ходе осуществления диссертационного исследования за каждым образцом сохранялся код штамма ВКПМ. Лиофилизированные культуры штаммов активировали в соответствии с рекомендациями БРЦ ВКПМ. Активированные культуры поддерживали в пробирках на скошенной агаризованной среде при температуре  $4 \pm 2$  °C в течение не более 30 дней. Перед проведением экспериментов культуры пересеивали на свежую питательную среду.

Чистоту культур контролировали при активации, после хранения и перед использованием в экспериментах посредством штрихового посева до

изолированных колоний, оценки колониальной морфологии и микроскопического исследования клеток с окраской по Граму. Для спорообразующих изолятов дополнительно оценивали наличие эндоспор. Для каждого штамма регистрировали дату активации, состав питательной среды, условия хранения.

Для предотвращения перекрёстной контаминации работы со штаммами выполняли в асептических условиях с использованием стерильных питательных сред, одноразовых расходных материалов и индивидуально промаркированной лабораторной посуды. Рабочие поверхности и инструменты обрабатывали до и после работы с каждой культурой. Одновременно с посевами инкубировали незасеянные образцы соответствующих питательных сред, использованные в качестве отрицательного контроля их стерильности.

#### **2.4.2 Изучение ростостимулирующих свойств ризобактерий**

Для активации штаммов лиофильную культуру вносили в 5 см<sup>3</sup> 1 % пептонной воды и культивировали в шейкере-инкубаторе LSI-3016A в течение 24 ч при температуре 28–30 °С и скорости 120 об/мин. Далее полученную суспензию переносили в 50 см<sup>3</sup> ГМФ-бульона с добавлением 10 г/дм<sup>3</sup> пептона и культивировали в условиях, описанных ранее.

Для получения единичных колоний из жидкой питательной среды осуществляли пересев на твердую среду (ГМФ-агар с добавлением 10 г/дм<sup>3</sup> пептона) в чашки Петри глубинным способом. Хранили культуры на скошенном агаре на среде, указанной ранее.

Для определения культуральных свойств выделенных штаммов использовали метод посева с помощью шпателя Дригальского, описанный в работе Шишкина и Просекова, на ГМФ-агар [100]. Морфологические свойства определяли по методике, описанной Кулясовым и Халгаевым [39].

Ростостимулирующую и антагонистическую активности отдельных штаммов и консорциумов на их основе исследовали по следующим методикам.

Определение накопления общего азота. Готовили суспензию бактериального штамма в физиологическом растворе с коэффициентом мутности 0,8–1,0 по МакФарланду с использованием денситометра. Затем 1 см<sup>3</sup> полученной суспензии добавляли в 10 см<sup>3</sup> питательной среды следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: 10,0 глюкозы; 5,0 магния сернокислого 7-водного ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ); 1,0 калия фосфорнокислого 2-замещенного 3-водного ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ); 0,005 натрия молибденовокислого 2-водного ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ); 5,0 натрия хлористого ( $\text{NaCl}$ ); 0,01 железа II сернокислого 7-водного ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ); 2,0 кальция углекислого ( $\text{CaCO}_3$ ). Полученную смесь культивировали в шейкере-инкубаторе в течение 2 сут. при температуре 28–30 °С и скорости 120 об/мин [265]. Далее отделяли культуральную жидкость от клеток центрифугированием в течение 10 мин при 8000 об/мин. Содержание азота определяли с помощью анализатора азота Rapid N Cube [147].

Для определения способности к производству аммиака отдельными штаммами и консорциумами готовили бесклеточную культуральную жидкость исследуемых штаммов по методике, описанной в анализе способности к накоплению общего азота на 1 % пептонной воде. Далее к 3 см<sup>3</sup> бесклеточной культуральной жидкости добавляли 150 мкл реактива Несслера и встряхивали. Одновременно в тех же условиях проводили контрольный опыт, в качестве контроля использовали питательную среду. Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 450 нм. Оптическую плотность образца определяли по формуле 2.4.1:

$$\text{ОП} = \text{ОП}_\text{э} - \text{ОП}_\text{к}, \quad (2.4.1)$$

где ОП – расчетная оптическая плотность образца;

ОП<sub>э</sub> – экспериментальная оптическая плотность образца;

ОП<sub>к</sub> – оптическая плотность контроля.

Количество произведенного аммиака определяли по градуировочному графику стандартного раствора аммония в диапазоне от 50 до 300 мкг/см<sup>3</sup>.

Солюбилизация фосфатов. Готовили питательную среду следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: 5,0 кальция фосфорнокислого ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), 20,0 глюкозы; 0,2 натрия хлористого; 0,1 магния сернокислого 7-водного; 0,01 марганца сернокислого 5-водного ( $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ); 0,01 железа II сернокислого 7-водного. Культивировали штаммы в шейкере-инкубаторе в течение 48 ч при температуре 28–30 °С и скорости вращения 110 об/мин. К 1 см<sup>3</sup> бесклеточной культуральной жидкости, полученной по методике, описанной ранее, добавляли 4,5 см<sup>3</sup> раствора хлормолибденовой кислоты. Выдерживали полученный раствор при температуре 22–24 °С и измеряли оптическую плотность при длине волны 600 нм. Одновременно проводили контрольный опыт, в качестве контроля использовали питательную среду. Оптическую плотность образца определяли по формуле 2.4.2.1. Количество растворенного фосфора определяли по калибровочному графику стандартного раствора калия фосфорнокислого 1-замещенного ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) в пределах 50–300 мкг/см<sup>3</sup>.

Солюбилизация цинка. Для этого культивировали микроорганизмы на среде следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: 10,0 глюкозы; 1,0 аммония сернокислого ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ); 0,2 калия хлористого ( $\text{KCl}$ ); 0,1 калия фосфорнокислого 2-замещенного 3-водного; 0,2 магния сернокислого 7-водного; 1,0 цинка окиси ( $\text{ZnO}$ ); 15,0 агар-агара. Признаком способности к солюбилизации цинка служило наличие светлого ареола (зоны гало) вокруг роста культуры на чашках Петри [292].

Образование биопленок. Для этого культивировали микроорганизмы на среде следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: 0,8 конго красного; 50,0 сахарозы; 37,0 мозгового экстракта (Brain Heart Infusion Broth); 15,0 агар-агара. Признаком способности к образованию биопленок служило кристаллическое почернение колоний сухой консистенции [292].

Производство АЦК-дезаминазы. Для этого культивировали микроорганизмы на среде следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: 2,0 аммония сернокислого; 4,0 калия фосфорнокислого однозамещенного; 6,0 натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ); 0,2 магния сернокислого 7-водного; 0,001 железа II сернокислого 7-водного; 15,0 агар-агара; а также по 1 см<sup>3</sup> следующих растворов (г/дм<sup>3</sup>): 0,01 борной кислоты ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ); 0,01 марганца сернокислого 5-водного; 0,07

цинка сернокислого 7-водного ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ); 0,05 меди сернокислой 5-водной ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Признаком способности к производству АЦК-деаминазы служило наличие роста культуры на чашках Петри [292].

Для определения количества сидерофоров готовили бесклеточную культуральную жидкость исследуемых штаммов по методике, описанной в анализе способности к производству аммиака на жидкой питательной среде Лурия-Бертани в модификации Миллера (ЛБ). Далее к 1 см<sup>3</sup> бесклеточной культуральной жидкости добавляли 1 см<sup>3</sup> свежеприготовленного реагента Chrome Azurol S (1,5 см<sup>3</sup> 0,016 % раствора железа III хлористого 6-водного ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) в 10 М растворе соляной кислоты (HCl) смешивали с 7,5 см<sup>3</sup> 1,21 % раствора хромазуrol S, а затем к этому раствору добавляли дистиллированную воду до 100 см<sup>3</sup>). Полученный раствор выдерживали в течение 20 мин при температуре 22–24 °С. Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при длине волны 630 нм. Одновременно в тех же условиях проводили контрольный опыт, в качестве контроля использовали питательную среду. Концентрацию сидерофоров определяли по формуле (2.4.2) [114]:

$$C_{\text{сид}} = \frac{\text{ОП}_{\text{об}} - \text{ОП}_{\text{к}}}{\text{ОП}_{\text{к}}} \times 100 \%, \quad (2.4.2)$$

где  $C_{\text{сид}}$  – концентрация сидерофоров, %;

$\text{ОП}_{\text{об}}$  – оптическая плотность образца;

$\text{ОП}_{\text{к}}$  – оптическая плотность контрольного образца.

Для определения количества синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты к 1 см<sup>3</sup> бесклеточной культуральной жидкости, подготовленной по методике, описанной в анализе на сидерофоров, добавляли 1 см<sup>3</sup> реагента Сальковского. Спустя 30 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 535 нм. Одновременно в тех же условиях проводили контрольный опыт, в качестве контроля использовали

питательную среду. Количество синтезируемой индолил-3-уксусной кислоты определяли по градуировочному графику стандартного раствора индолил-3-уксусной кислоты в диапазоне от 0,2 до 10 мкг/см<sup>3</sup> [239].

Для определения количества синтезируемой гиббереллиновой кислоты к 3 см<sup>3</sup> бесклеточной культуральной жидкости, подготовленной по методике, описанной в анализе на сидерофоры, добавляли по 420 мкл 1 М раствора цинка уксуснокислого 2-водного ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) и 10,6 % раствора калия железистосинеродистого ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) и энергично встряхивали. Далее центрифугировали полученный раствор в течение 10 мин при скорости 7500 об/мин и смешивали полученный супернатант с 30 % соляной кислотой в соотношении 1:1. Выдерживали в течение 75 мин при температуре 22–24 °С. Оптическую плотность измеряли по отношению к 5 % соляной кислоте при длине волны 254 нм. Количество синтезируемой гиббереллиновой кислоты определяли по градуировочному графику стандартного раствора гиббереллиновой кислоты в диапазоне от 0,5 до 5 мг/см<sup>3</sup> [5].

Для выбора перспективных микроорганизмов ранжировали показатели ростостимулирующей активности. Значимость показателей представлена в таблице 2.4.1, баллы – в таблице 2.4.2.

Таблица 2.4.1 – Значимость показателей ростостимулирующей активности штаммов

| Показатель                        | Значимость |
|-----------------------------------|------------|
| Накопление общего азота           | 0,25       |
| Производство аммиака              | 0,20       |
| Солюбилизация фосфатов            | 0,25       |
| Солюбилизация цинка               | 0,01       |
| Образование биопленок             | 0,01       |
| Производство АЦК-деаминазы        | 0,01       |
| Сидерофоры                        | 0,23       |
| Синтез индолил-3-уксусной кислоты | 0,02       |
| Синтез гиббереллиновой кислоты    | 0,02       |

Таблица 2.4.2 – Баллы показателей ростостимулирующей активности штаммов

| Показатель                                             | Балл      |           |           |           |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                                        | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         |
| Накопление общего азота, мкг/см <sup>3</sup>           | 30–50     | 51–90     | 91–160    | 161–200   | 201–220   |
| Производство аммиака, мкг/см <sup>3</sup>              | 110–130   | 131–160   | 161–210   | 211–240   | 241–260   |
| Солюбилизация фосфатов, мкг/см <sup>3</sup>            | 85–110    | 111–160   | 161–225   | 226–275   | 276–300   |
| Сидерофоры, %                                          | 30–32     | 33–38     | 39–46     | 47–52     | 53–55     |
| Синтез индолил-3-уксусной кислоты, мкг/см <sup>3</sup> | 0,1–2,0   | 2,1–5,0   | 5,1–9,0   | 9,1–12,0  | 12,1–14,0 |
| Синтез гиббереллиновой кислоты, мкг/см <sup>3</sup>    | 0,55–0,60 | 0,61–0,75 | 0,76–1,05 | 1,06–1,20 | 1,21–1,25 |

Примечание: при отсутствии признаков солюбилизации цинка, образования биопленок, а также производства АЦК-деаминазы присваивается «0» баллов, при положительной оценке – «5» баллов.

Для определения антагонистической активности использовали следующие штаммы фитопатогенов: *Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006, *Erwinia rhapontici* B-9292, *Xanthomonas campestris* B-4102. Фитопатогенные микроорганизмы культивировали в пробирке с картофельно-глюкозным агаром (для грибов) либо с ГМФ-агаром (для бактерий). Суточную культуру исследуемых бактерий, выращенную на жидкой питательной среде ЛБ, засевали в чашки Петри глубинным способом на агаризованную среду ЛБ и инкубировали в течение 24 ч при температуре 28–30 °С. Затем вырезали агаровый блок с исследуемой культурой и вставляли его в лунку агарового диска другой чашки Петри с засеянными фитопатогенами. Фитопатоген засевали поверхностно, используя смывы со скошенного агара. Посев суспензии мутностью 0,8 по МакФарланду ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>) осуществляли «газоном». Чашки Петри выдерживали в течение 8 ч в холодильнике при температуре 4 °С для диффузии метаболитов монокультур бактерий из блока в толщу агара с тест-культурой, а затем инкубировали в термостате при 26–28 °С [5, 57, 284].

Для выбора перспективных микроорганизмов-продуцентов ранжировали показатели антагонистической активности. Значимость показателей представлена в таблице 2.4.3, баллы – в таблице 2.4.4.

Таблица 2.4.3 – Значимость показателей антагонистической активности штаммов

| Показатель                           | Значимость |
|--------------------------------------|------------|
| <i>Fusarium graminearum</i> F-877    | 0,22       |
| <i>Bipolaris sorokiniana</i> F-529   | 0,22       |
| <i>Botrytis cinerea</i> F-1006       | 0,22       |
| <i>Erwinia rhapontici</i> B-9292     | 0,17       |
| <i>Xanthomonas campestris</i> B-4102 | 0,17       |

Таблица 2.4.4 – Баллы показателя антагонистической активности штаммов

| 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 | 8,6–9,5 |

Ранжирование показателей ростостимулирующей и антагонистической активностей суммировали для определения общего ранга штамма.

### 2.4.3 Конструирование микробных консорциумов

Изучение биосовместимости штаммов методом совместного культивирования. В чашку Петри с агаризованной средой ЛБ ровным слоем наносили тест-культуру, в лунки диаметром 4 мм вносили культуральную жидкость, полученную по методике, описанной в анализе на продуцирование сидерофоров. Культивировали при температуре  $28 \pm 2$  °C в течение 24 ч. Культуры считались биосовместимыми, если не образовывалась зона ингибирования [62, 170].

Для составления консорциумов готовили чистые культуры в жидкой питательной среде ЛБ до оптической плотности 0,8–1,0 по МакФарланду с помощью денситометра Densichek plus. Культивировали в течение 24 ч при  $28 \pm 2$  °C и 110 об/мин. Затем в пробирку с жидкой питательной средой ЛБ вносили суспензии микроорганизмов, входящих в состав консорциума так, чтобы их общий объем составлял 5 % от объема среды (количество вносимой суспензии конкретного штамма зависело от их соотношения в составе консорциума) [62].

Лабораторную апробацию перспективных штаммов и консорциумов проводили в соответствии с ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Метод определения всхожести». Для анализа использовали семена яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сортов «Сибирский Альянс», «Памяти Афродиты» и «Надежда Кузбасса». Аналог биологического удобрения – «Азофит». Варианты обработки семян злаковых культур представлены в таблице 2.4.4.

Таблица 2.4.4 – Варианты обработки семян яровой мягкой пшеницы

| Опыт        | Описание                                                                            |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Вариант 1.1 | Обработка дистиллированной водой                                                    |
| Вариант 1.2 | Обработка микробиологическим удобрением на основе азотфиксирующих бактерий «Азофит» |
| Вариант 2.1 | Обработка штаммом <i>Ensifer meliloti</i> B-219                                     |
| Вариант 2.2 | Обработка штаммом <i>Ensifer mexicanus</i> B-4064                                   |
| Вариант 2.3 | Обработка штаммом <i>Rhizobium tropici</i> B-216                                    |
| Вариант 3.1 | Обработка консорциумом № 4                                                          |
| Вариант 3.2 | Обработка консорциумом № 5                                                          |

На 3 сутки измеряли энергию прорастания и на 7 сутки измеряли всхожесть (формула 2.4.3), длину ростка и корня, количество хлорофилла а и b, каротиноидов.

$$X = \frac{C_{\text{вс}}}{C_{\text{пос}}} \times 100 \%, \quad (2.4.3)$$

где X – энергия прорастания/всхожесть, %;

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

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

Для определения содержания пигментов измельченные листья экстрагировали 50 см<sup>3</sup> 70 % этанолом на водяной бане и фильтровали. К 4 см<sup>3</sup> полученного экстракта добавляли 21 см<sup>3</sup> 96 % этилового спирта. Затем поглощение пигмента измеряли спектрофотометрически при длинах волн 665 нм и 649 нм (общий хлорофилл), а также 480 нм (каротиноиды) [65, 254].

Содержание азота и белка в наземной части растений определяли на анализаторе азота Rapid N Cube в соответствии с методикой, описанной в технической документации к оборудованию [65].

#### **2.4.4 Геномные и транскриптомные исследования перспективных штаммов**

Геномные и транскриптомные исследования осуществляли в Центре коллективного пользования «Геномика» ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины сибирского отделения российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН).

Культивирование штаммов микроорганизмов. Для геномного анализа штаммы выращивали на агаризованной питательной среде. Предварительно для активации штаммов лиофильную культуру вносили в 5 см<sup>3</sup> 1 % пептонной воды и культивировали в шейкере-инкубаторе LSI-3016A в течение 24 ч при температуре 28–30 °C и скорости 120 об/мин.

Для транскриптомного анализа штаммы выращивали на жидкой питательной среде. 5 см<sup>3</sup> суспензии активированных штаммов, полученной способом, описанным выше, переносили в 50 см<sup>3</sup> ГМФ-бульона с добавлением 10 г/дм<sup>3</sup> пептона и культивировали в течение 24 ч при температуре 28–30 °C и скорости 120 об/мин.

Выделение ДНК из бактерий проводили с помощью набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research). РНК выделяли с помощью набора Purelink RNA Mini Kit с последующей обработкой ДНКазой Turbo DNase (Thermo Scientific). Качество РНК оценивали на Bioanalyzer 2100 с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (Agilent). Количество ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Thermo Scientific), а также на флуориметре Qubit (Invitrogen).

Геномное секвенирование на платформе Polyseq. Из выделенной бактериальной ДНК готовили ДНК-библиотеки с помощью наборов Barcode Library Preparation Kit и Ligation Barcode Kit (Polyseq Biotech). Библиотеки

смешивали в эквимольном соотношении и секвенировали на проточной ячейке PolyseqCell Sequencing Chip на платформе Polyseq One (Polyseq Biotech) [25].

Транскриптомное секвенирование на платформе MGISEQ. Для бактериальной РНК проводили деплецию рРНК с помощью набора Ribo-Zero rRNA removal kit (Epicentre). Эффективность деплеции оценивали на Bioanalyzer 2100 с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (Agilent). Далее при конструировании ДНК-библиотек использовался набор NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep kit for Illumina и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Unique Dual Index UMI Adaptors RNA Set 1) (New England BioLabs). Качество ДНК-библиотек оценивали на приборе Qsep100 с использованием набора F3 Fast Cartridge (BiOptic). Количество библиотек определялось на флуориметре Qubit (Invitrogen) [25].

ДНК-библиотеки смешивали эквимольно и секвенировали на платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech) по протоколам производителя с использованием набора DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set PE100 (MGI Tech), позволяющего проводить чтение библиотеки с обеих сторон (paired end) [25].

Геномное секвенирование на платформе MGISEQ. Бактериальную ДНК фрагментировали ультразвуком на приборе Covaris S2 (Covaris), обрабатывали РНКазой А (Thermo Scientific) и готовили ДНК-библиотеки с использованием наборов NEBNext Ultra II DNA library prepkit for Illumina и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (UDI set3) (New England BioLabs). Качество ДНК-библиотек оценивали на приборе Qsep100 с использованием набора F3 Fast Cartridge (BiOptic). Количество библиотек определялось на флуориметре Qubit (Invitrogen) [25].

ДНК-библиотеки смешивались эквимольно и секвенировали на платформе MGISEQ-2000 (MGI Tech) по протоколам производителя с использованием набора DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Set PE100 (MGI Tech), позволяющего проводить чтение библиотеки с обеих сторон (paired end) [25].

Биоинформатический анализ геномных исследований. Для биоинформатического анализа прочтения, полученные на Polyseq One, фильтровались с помощью Fitlong v0.2.1 [175]. Далее проводилась сборка тремя различными ассемблерами: Flye v2.9.2 [116], Minipolish v0.1.3 [298] и Raven v1.8.1

[248]. Для полученных сборок проводили общую кластеризацию контигов, их выравнивание и нахождение консенсуса с помощью Tricycle v0.5.4 [291].

Далее в полученных геномах исправляли ошибки. На первом этапе исправления ошибок проводили программой Medaka v1.7.2 [209], использующей длинные прочтения Polyseq One. На втором этапе «полировка» генома осуществлялась при последовательном использовании Polypolish v0.5.0 [299] и POLCA v4.1.0 [306] 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 [206].

Корректировали ошибки секвенирования с помощью SPAdes v4.0.0 [25, 270] в режиме `--only-error-correction`. Полноту сборки геномов оценивали по однокопийным генам-ортологам с помощью BUSCO v5.5.0 [25, 135]. Аннотацию геномов проводили программой Bakta v1.11.4 [25, 121]. Таксономическую идентификацию геномов выполняли GTDB-tk v2.4.1 с использованием базы GTDB r220.0 [25, 185].

Биоинформатический анализ транскриптомных исследований. Количество прочтений, полученных для каждого образца, определяли с помощью программы Seqfu v1.22.3 [277]. Анализ качества прочтений проводился с использованием SOAPnuke v2.1.9 [268]. Для удаления адаптерных последовательностей и фильтрации по качеству использовался cutadapt v.5.0 [206].

Отфильтрованные таким образом риды использовались для картирования на собранные *de novo* и аннотированные бактериальные геномы. Картирование выполняли с помощью CLC Genomics Workbench 21.0.5 (Qiagen) [246] со следующими параметрами: Similarity fraction=0.8, Length fraction=0.8, Mismatch cost=2, Insertion cost=3, Deletion cost=3 и получали Bam-файл. Таблицы с результатами анализа экспрессии генов экспортировали в *xlsx* файл.

### 2.4.5 Практическая реализация результатов исследования

Для разработки эффективного биопрепарата необходим подбор условий культивирования перспективного микробного консорциума с целью усиления его ростостимулирующих свойств.

Для подбора температуры культивирования разработанного биопрепарата к 40 см<sup>3</sup> питательной среды оптимального состава добавляли 1,2 см<sup>3</sup> суспензии консорциума, состоящего из *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* в соотношении 2:1:1. Культивировали в 8-позиционном биореакторе в течение 24 ч при температуре 25, 28, 32, 35 и 45 °С [274].

Для подбора основных компонентов питательной среды перспективного консорциума к 40 см<sup>3</sup> питательной среды определенного состава (таблица 2.4.5) добавляли 1,2 см<sup>3</sup> суспензии консорциума. Далее культивировали с использованием 8-ми позиционного биореактора в течение 24 ч при подобранной температуре культивирования [274].

Таблица 2.4.5 – Составы питательных сред для культивирования консорциума

| Среды | Компоненты питательной среды |                    |      |        |         |          |
|-------|------------------------------|--------------------|------|--------|---------|----------|
|       | триптон                      | дрожжевой экстракт | NaCl | маннит | меласса | мочевина |
| № 1   | 10                           | 5                  | 10   | –      | –       | –        |
| № 2   | 10                           | 5                  | 10   | 5      | –       | –        |
| № 3   | 10                           | 5                  | 10   | –      | 6       | –        |
| № 4   | 10                           | 5                  | 10   | –      | –       | 1        |
| № 5   | 10                           | 5                  | 10   | 5      | –       | 1        |
| № 6   | 10                           | 5                  | 10   | –      | 6       | 1        |

Для подбора дополнительных компонентов питательной среды перспективного консорциума к 40 см<sup>3</sup> питательной среды определенного состава (таблица 2.4.6) добавляли 1,2 см<sup>3</sup> суспензии консорциума. Далее культивировали с использованием 8-ми позиционного биореактора в течение 24 ч при подобранной температуре культивирования с использованием выбранной питательной среды [274].

Таблица 2.4.6 – Составы питательных сред с внесением дополнительных компонентов к выбранной основе для культивирования биопрепарата

| Среда | Компоненты      |        |                                 |                                 |                   |
|-------|-----------------|--------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
|       | Выбранная среда | Биотин | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | MgSO <sub>4</sub> |
| № 1.1 |                 | –      | –                               | –                               | –                 |
| № 2.1 |                 | 0,1    | –                               | –                               | –                 |
| № 3.1 |                 | –      | 0,1                             | 0,4                             | 0,2               |
| № 4.1 |                 | 0,1    | 0,1                             | 0,4                             | 0,2               |

Количества сидерофоров, индолил-3-уксусной и гиббереллиновой кислот определяли аналогично методике, представленной в пункте 2.4.2.

Лабораторную апробацию перспективных штаммов и консорциумов проводили в соответствии с ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Метод определения всхожести». Для анализа использовали семена яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Экстра. Аналог биологического удобрения – микробиологическое удобрение на основе азотфиксирующих бактерий «Азофит». Инкубировали с использованием стеллажа для роста растений «Стеллар-Фито LINE» при температуре 22±2 °С. Варианты обработки семян злаковых культур представлены в таблице 2.4.7.

Таблица 2.4.7 – Варианты обработки семян яровой мягкой пшеницы

| Опыт         | Описание                                                                                                  |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Вариант К1   | Обработка дистиллированной водой                                                                          |
| Вариант К2   | Обработка микробиологическим удобрением на основе азотфиксирующих бактерий «Азофит» (согласно инструкции) |
| Вариант Ш1.1 | Обработка штаммом <i>Priestia aryabhattai</i> , 1 дм <sup>3</sup> /т                                      |
| Вариант Ш2.1 | Обработка штаммом <i>Bacillus subtilis</i> , 1 дм <sup>3</sup> /т                                         |
| Вариант Ш3.1 | Обработка штаммом <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , 1 дм <sup>3</sup> /т                                  |
| Вариант Б1.1 | Обработка биопрепаратом, 1 дм <sup>3</sup> /т                                                             |
| Вариант Ш1.2 | Обработка штаммом <i>Priestia aryabhattai</i> , 2 дм <sup>3</sup> /т                                      |
| Вариант Ш2.2 | Обработка штаммом <i>Bacillus subtilis</i> , 2 дм <sup>3</sup> /т                                         |
| Вариант Ш3.2 | Обработка штаммом <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , 2 дм <sup>3</sup> /т                                  |
| Вариант Б1.2 | Обработка биопрепаратом, 2 дм <sup>3</sup> /т                                                             |
| Вариант Ш1.3 | Обработка штаммом <i>Priestia aryabhattai</i> , 3 дм <sup>3</sup> /т                                      |
| Вариант Ш2.3 | Обработка штаммом <i>Bacillus subtilis</i> , 3 дм <sup>3</sup> /т                                         |
| Вариант Ш3.3 | Обработка штаммом <i>Pseudomonas chlororaphis</i> , 3 дм <sup>3</sup> /т                                  |
| Вариант Б1.3 | Обработка биопрепаратом, 3 дм <sup>3</sup> /т                                                             |

На 7 сутки измеряли всхожесть, длину ростка и корня, количество общего хлорофилла, каротиноидов аналогично методике, описанной в пункте 2.4.2. Определение содержания пигментов, азота и белка в наземной части пшеницы осуществляли аналогично методике, описанной в пункте 2.4.2.

Для проведения МТТ-теста культуральные жидкости для образцов *Pseudomonas chlororaphis*, *Priestia aryabhattai* и *Bacillus subtilis* стерилизовали фильтрованием через полиэфирсульфоновые мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Для исследования использовалась культура клеток НЕК293Т. Согласно протоколу исследования клетки рассаживали в 96-луночные планшеты по 12 тысяч клеток в лунку в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы. Через 24 часа добавляли исследуемый препарат в различных количествах, ещё через 24 часа или 48 часов среду с препаратом отбирали, в лунки вносили реактив МТТ, смешанный с культуральной средой DMEM, с финальной концентрацией 0,25 мг/см<sup>3</sup>. После 4 часов инкубации среду с реактивом отбирали, образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в DMSO и снимали оптическую плотность раствора при длине волны 570 нм. Для оценки фона использовали лунку, в которой исходно была только среда без клеток. Далее значение фона вычитали из остальных значений, каждое значение оптической плотности делили на среднее по группе контроля и умножали на 100 %. Затем проводили двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и тест Тьюки. Выбрали концентрации 1, 25, 50 и 100 % от объёма культуральной среды для всех экспериментов. Каждый эксперимент был повторён дважды по 7 технических реплик на каждое разведение препарата культуральной жидкости [112].

Определение показателей качества и безопасности разработанного биопрепарата. 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.

Для определения срока годности разработанного опытного биопрепарата проводили оценку сохранности жизнеспособных микроорганизмов в процессе хранения. Свежеизготовленный препарат асептически фасовали в стерильные герметично закрываемые емкости и хранили при температуре  $4 \pm 1$  °С в течение 6 мес. Отбор проб осуществляли непосредственно после получения препарата, а затем через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 мес. хранения.

Количество жизнеспособных микроорганизмов определяли методом последовательных десятикратных разведений с последующим высевом на плотную питательную среду [155]. Для проведения анализа из каждой исследуемой пробы асептически отбирали навеску препарата, вносили в стерильный физиологический раствор и тщательно гомогенизировали. Из полученной исходной суспензии готовили серию десятикратных разведений. Аликвоты соответствующих разведений высевали на поверхность плотной питательной среды и равномерно распределяли стерильным шпателем.

Посевы инкубировали при температуре 28–30 °С до формирования визуально учитываемых колоний. После инкубирования проводили подсчет выросших колоний и рассчитывали титр жизнеспособных микроорганизмов, выраженный в КОЕ/см<sup>3</sup>, по формуле 2.4.4.

$$T = \frac{N \times 10^n}{V}, \quad (2.4.4)$$

где T – титр жизнеспособных микроорганизмов, КОЕ/см<sup>3</sup>;

N – среднее количество колоний, выросших на чашке Петри, ед.;

n – степень десятикратного разведения;

V – объем посевного материала, внесенного на питательную среду, см<sup>3</sup>.

Расчет титра препарата производили с учетом степени разведения и объема внесенного инокулята.

## 2.5 Заключение по главе 2

Для достижения поставленных целей был применен комплексный подход, включающий стандартные микробиологические, биохимические, генетические и агрономические методы. Проведены лабораторные эксперименты для выделения, идентификации и оценки агрономически ценных свойств ризобактерий и биопрепарата.

Статистическая обработка данных проводилась в Microsoft Excel. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$ SD ( $n=3$ ). 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 диссертационного исследования.

### ГЛАВА 3 ИССЛЕДОВАНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ

В главе представлены результаты изучения морфологических, культуральных свойств, а также ростостимулирующей и антагонистической активности коллекционных штаммов ростостимулирующих микроорганизмов.

#### 3.1 Изучение культурально-морфологических свойств штаммов

Культурально-морфологические признаки исследуемых штаммов представлены на рисунках 3.1.1–3.1.15. Согласно полученным данным штамм *Azospirillum brasilense* В-11094 представлял собой одиночные палочки. При культивировании на агаризованных питательных средах данный микроорганизм формирует круглые матовые колонии бежевого цвета.



Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

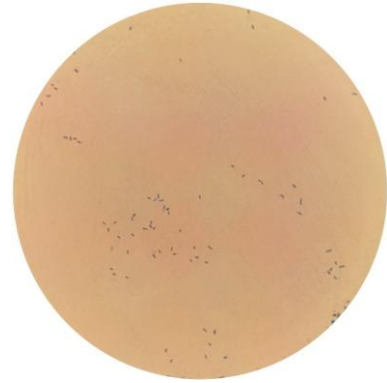
Рисунок 3.1.1 – Культурально-морфологические признаки  
*Azospirillum brasilense* В-11094

Штаммы *Azotobacter chroococcum* В-4148 и *Azotobacter chroococcum* В-8739 характеризуются идентичными культурально-морфологическими признаками.

Микроскопический анализ выявил наличие одиночных палочек. При культивировании на агаризованных питательных средах штаммы формировали круглые колонии с глянцевой поверхностью, бежевого цвета.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.2 – Культурально-морфологические признаки

*Azotobacter chroococcum* B-4148



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.3 – Культурально-морфологические признаки

*Azotobacter chroococcum* B-8739

Исследуемый штамм *Azotobacter vinelandii* B-932 представлен преимущественно одиночными или попарно расположенными палочковидными клетками. При культивировании на агаризованной питательной среде микроорганизм формирует колонии округлой формы, с глянцевой поверхностью.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.4 – Культурально-морфологические признаки

*Azotobacter vinelandii* B-932



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.5 – Культурально-морфологические признаки

*Bacillus amyloliquefaciens* B-11265

Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 представлял собой одиночные палочки. При росте на плотной питательной среде образовывал глянцевые колонии круглой формы.

Штамм *Bacillus aryabhatai* B-13192 представлен преимущественно одиночными или попарно расположенными палочками. При росте на агаризованной питательной среде формировал глянцевые колонии круглой формы.



А



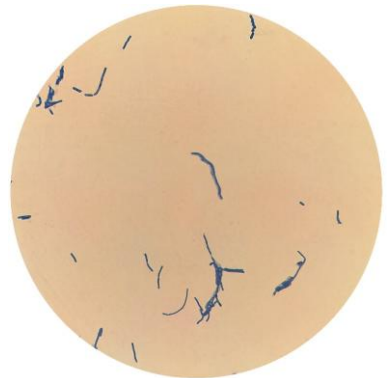
Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.6 – Культурально-морфологические признаки  
*Bacillus aryabhatai* В-13192



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.7 – Культурально-морфологические признаки *Ensifer meliloti* В-219

При микроскопировании *Ensifer meliloti* В-219 обнаружены палочки, объединенные попарно и в цепочки. При росте на плотной питательной среде формировал бежевые глянцевые колонии круглой формы.

Штамм *Ensifer mexicanus* В-4064 образовывал преимущественно одиночные или попарно расположенные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал глянцевые колонии круглой формы, бежевого цвета.



Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.8 – Культурально-морфологические признаки  
*Ensifer mexicanus* B-4064

При микроскопировании штамма *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 обнаружены одиночные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал глянцевые колонии круглой формы, бежевого цвета.



Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.9 – Культурально-морфологические признаки  
*Mesorhizobium mediterraneum* B-4062

При микроскопировании штамма *Pantoea ananatis* B-5292 обнаружены одиночные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал желтые глянцевые колонии круглой формы.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.10 – Культурально-морфологические признаки *Pantoea ananatis* B-5292

При микроскопировании штамма *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 обнаружены одиночные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал матовые колонии круглой формы, бежевого цвета.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.11 – Культурально-морфологические признаки  
*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548

Штамм *Pseudomonas koreensis* B-3481 представлял одиночные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал глянцевые колонии круглой формы, бежевого цвета.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

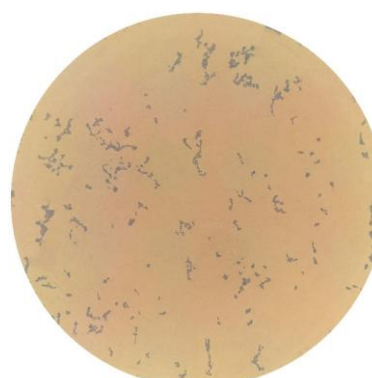
Рисунок 3.1.12 – Культурально-морфологические признаки

*Pseudomonas koreensis* B-3481

Штамм *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 представлял одиночные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал глянцевые колонии круглой формы, бежевого цвета.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

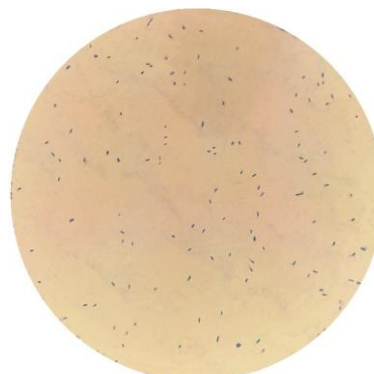
Рисунок 3.1.13 – Культурально-морфологические признаки

*Pseudomonas plecoglossicida* B-13802

При микроскопировании штамма *Rhizobium tropici* B-216 обнаружены одиночные палочки. При росте на агаризованной питательной среде штамм формировал глянцевые бежевые колонии круглой формы.



А



Б

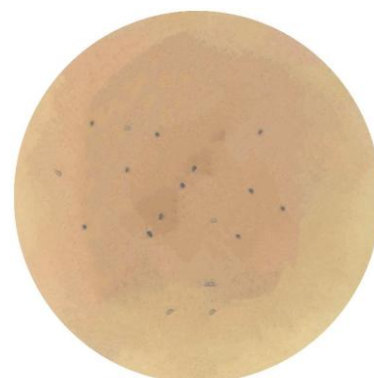
Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.14 – Культурально-морфологические признаки  
*Rhizobium tropici* B-216

Клетки *Zygorulasporea dagestanica* Y-4318 преимущественно округлые или овальные. Колонии круглые, глянцевые, светло-бежевого цвета.



А



Б

Примечание – А – рост на чашке Петри на среде ГМФ-агар, Б – микроскопирование фиксированного мазка при увеличении  $\times 1000$ , окрашенного метиленовым голубым

Рисунок 3.1.15 – Культурально-морфологические признаки  
*Zygorulasporea dagestanica* Y-4318

В процессе исследования культурально-морфологических свойств признаки контаминации не обнаружены.

### 3.2 Изучение биотехнологических характеристик штаммов

Для выбора перспективных ростостимулирующих штаммов осуществляли комплексную оценку функциональных характеристик, которые могут быть использованы в качестве основы для разработки биопрепаратов нового поколения. Особое внимание уделено оценке способности штаммов накапливать общий азот, производству аммиака, солюбилизации фосфатов и цинка, образованию биопленок, синтезу фитогормонов, сидерофоров, АЦК-дезаминазы.

Результаты исследования демонстрировали выраженную межштаммовую вариабельность способности изученных бактериальных культур к накоплению общего азота на безазотной среде.

Результаты исследования представлены на рисунке 3.2.1.

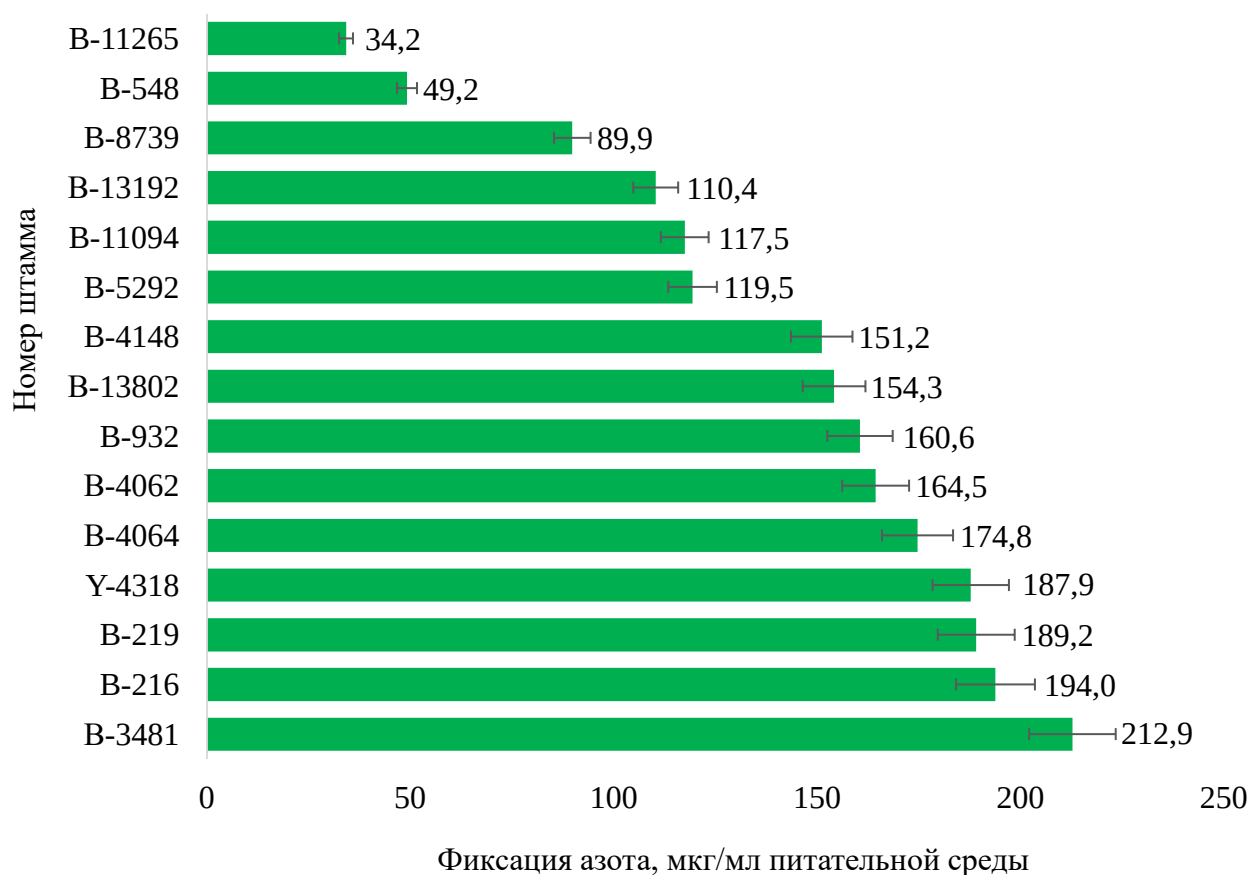


Рисунок 3.2.1 – Способность штаммов к накоплению общего азота

Показатели накопления общего азота варьировались в диапазоне от 34,2 до 212,9 мкг/см<sup>3</sup> питательной среды, что свидетельствует о существенной гетерогенности штаммов по данному показателю. Максимальная способность накапливать общий азот обнаружена у штамма *Pseudomonas koreensis* B-3481 (212,9 мкг/см<sup>3</sup>), в то время как минимальный уровень характерен для штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 (34,2 мкг/см<sup>3</sup>); таким образом, удельная активность наиболее продуктивного штамма превышала показатель наименее активного в 6,2 раза.

На основании полученных данных, исследованные микроорганизмы разделены по уровню накопления общего азота на безазотистой среде. К группе с низкой активностью (до 100 мкг/см<sup>3</sup>) относились штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Azotobacter chroococcum* B-8739, тогда как промежуточный уровень активности (110,4–119,5 мкг/см<sup>3</sup>) установлен у штаммов *Bacillus aryabhatai* B-13192, *Azospirillum brasilense* B-11094 и *Pantoea ananatis* B-5292. Более выраженная способность накапливать общий азот, соответствующая диапазону 151,2–174,8 мкг/см<sup>3</sup>, характерна для штаммов *Azotobacter chroococcum* B-4148, *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802, *Azotobacter vinelandii* B-932, *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 и *Ensifer mexicanus* B-4064. Наиболее перспективную группу формировали штаммы *Zygorhizobium dagestanica* Y-4318, *Ensifer meliloti* B-219, *Rhizobium tropici* B-216 и *Pseudomonas koreensis* B-3481, продемонстрировавшие значения выше 180 мкг/см<sup>3</sup>.

Количественные показатели накопления аммиака в культуральной среде (рисунок 3.2.2) варьировались в широком диапазоне от 112,5 до 395,9 мкг/см<sup>3</sup>, что свидетельствует о существенных различиях в интенсивности азотсодержащего метаболизма среди изученных бактериальных изолятов. Наименьшая аммонийпродуцирующая активность зафиксирована у штамма *Azotobacter chroococcum* B-4148 (112,5 мкг/см<sup>3</sup>). Близкие значения, характеризующие сравнительно низкую способность культур к накоплению аммиака, отмечены для штаммов *Azotobacter chroococcum* B-8739 (119,9 мкг/см<sup>3</sup>) и *Pantoea ananatis* B-5292 (145,9 мкг/см<sup>3</sup>).

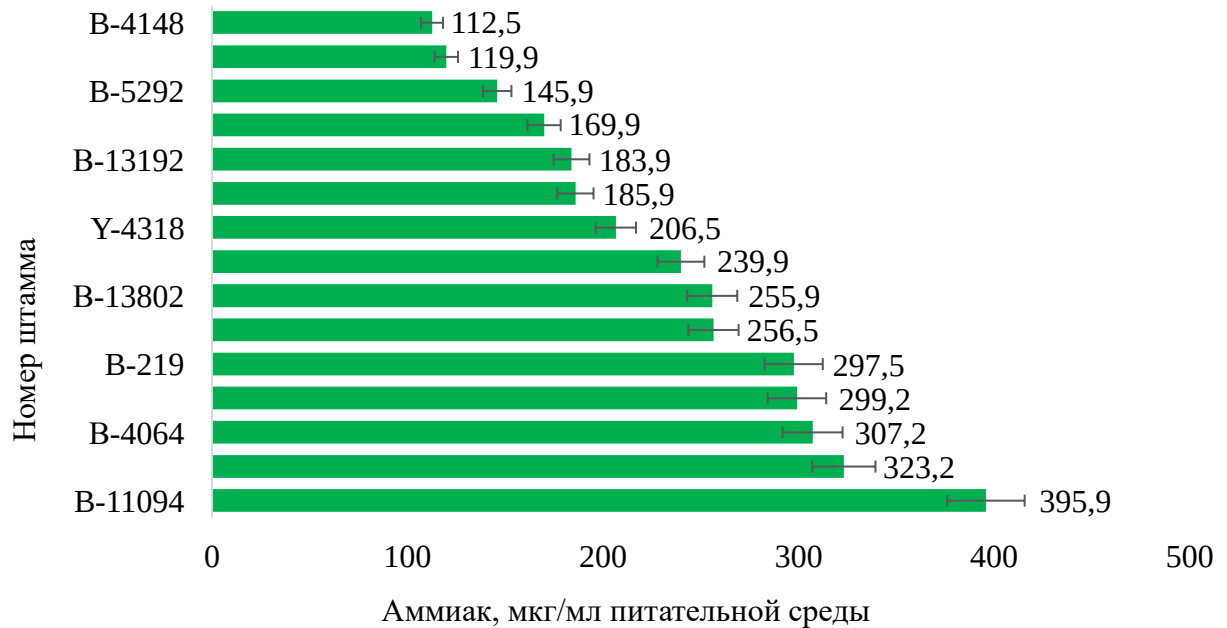


Рисунок 3.2.2 – Способность штаммов производить аммиак

Большинство исследуемых штаммов проявили умеренную и высокую способность продуцировать аммиак. Так, у штаммов *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062, *Bacillus aryabhatai* B-13192, *Rhizobium tropici* B-216 и *Zygorhizobium dageshanica* Y-4318 концентрация аммиака варьировала в пределах 169,9–206,5 мкг/см<sup>3</sup>. Более интенсивное образование аммиака наблюдали у штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 (239,9 мкг/см<sup>3</sup>), *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 (255,9 мкг/см<sup>3</sup>) и *Pseudomonas koreensis* B-3481 (256,5 мкг/см<sup>3</sup>).

Максимальные показатели демонстрировали штаммы *Ensifer meliloti* B-219, *Azotobacter vinelandii* B-932, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Azospirillum brasilense* B-11094. Лидирующее значение было установлено для штамма *Azospirillum brasilense* B-11094 (395,9 мкг/см<sup>3</sup>).

Представленные на рисунке 3.2.3 данные характеризуют способность исследуемых бактериальных штаммов к мобилизации труднорастворимых фосфорсодержащих соединений с последующим накоплением растворимого фосфора в питательной среде. Данный показатель является ключевым функциональным признаком ризобактерий, так как процесс трансформации фосфора в доступные формы способствует оптимизации минерального питания растений и повышению их ростовой активности.

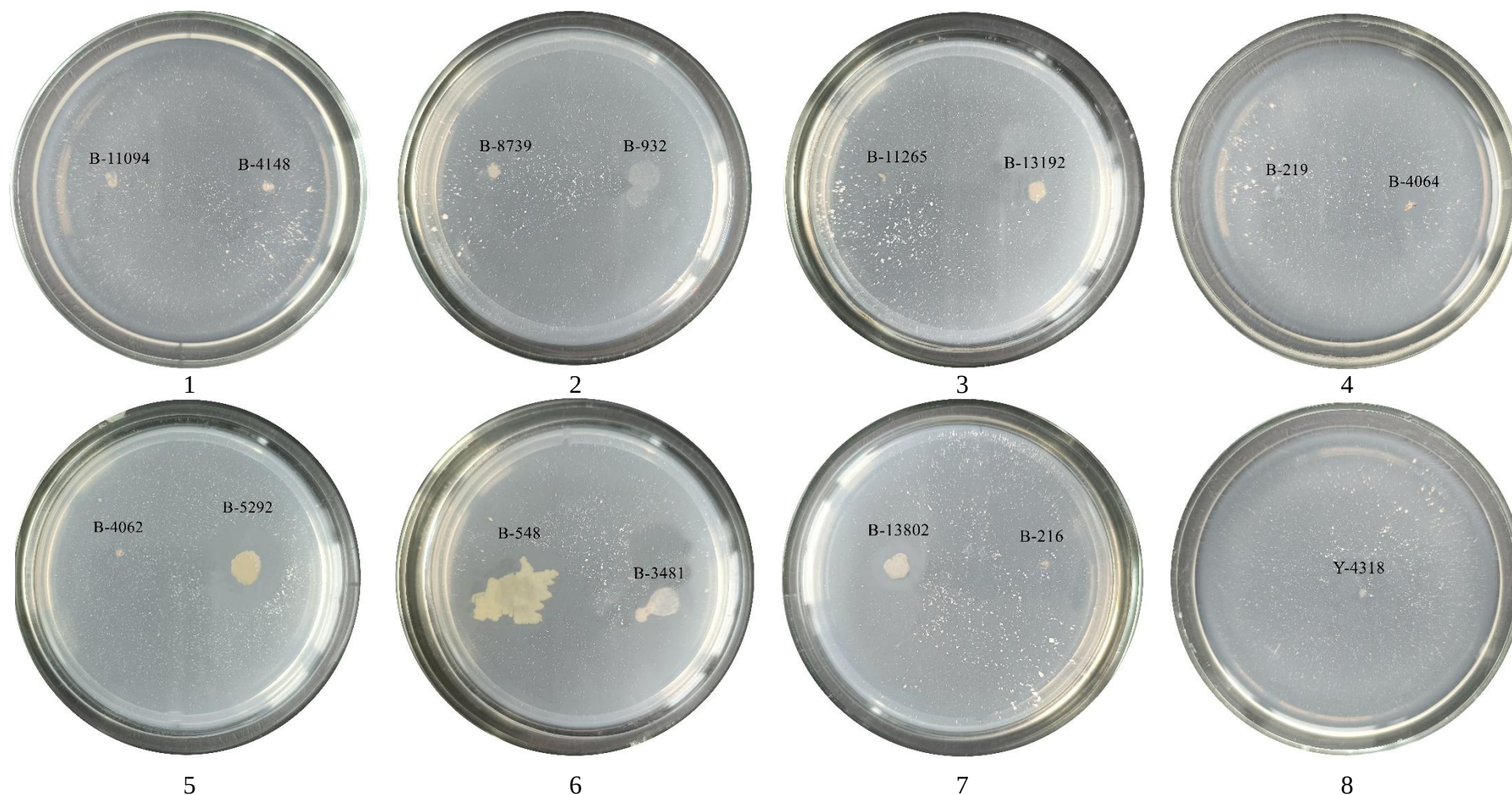


Рисунок 3.2.3 – Способность штаммов солюбилизировать фосфаты

Содержание растворимого фосфора в культуральной среде варьировало от 85,7 до 300,0 мкг/см<sup>3</sup>, что свидетельствует о выраженной гетерогенности исследованной коллекции по уровню фосфатмобилизующей активности. Максимальная интенсивность солюбилизации фосфатов была зафиксирована у штамма *Pseudomonas koreensis* B-3481 (300,0 мкг/см<sup>3</sup>), в то время как минимальное значение отмечено для штамма *Azotobacter vinelandii* B-932 (85,7 мкг/см<sup>3</sup>). Таким образом, различие между крайними показателями достигает 3,5 раза, что указывает на существенную вариабельность метаболической активности изученных штаммов в отношении мобилизации фосфатов.

Наиболее низкие значения содержания растворимого фосфора (в диапазоне 85,7–114,3 мкг/см<sup>3</sup>) характерны для штаммов *Azotobacter vinelandii* B-932, *Rhizobium tropici* B-216 и *Zygorhizula daghestanica* Y-4318. Умеренный уровень фосфатмобилизующей активности, соответствующий 128,6 мкг/см<sup>3</sup>, установлен для штаммов *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548.

На следующем этапе исследования оценивали способность штаммов солюбилизировать цинк, образовывать биопленки, продуцировать АЦК-деаминазу (рисунки 3.2.4–3.2.7).



Примечание – 1 – *Azospirillum brasilense* B-11094 и *Azotobacter chroococcum* B-4148; 2 – *Azotobacter chroococcum* B-8739 и *Azotobacter vinelandii* B-932; 3 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 и *Bacillus aryabhattai* B-13192; 4 – *Ensifer meliloti* B-219 и *Ensifer mexicanus* B-4064; 5 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 и *Pantoea ananatis* B-5292; 6 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Pseudomonas koreensis* B-3481; 7 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 и *Rhizobium tropici* B-216; 8 – *Zygorhizobium dagestanica* Y-4318

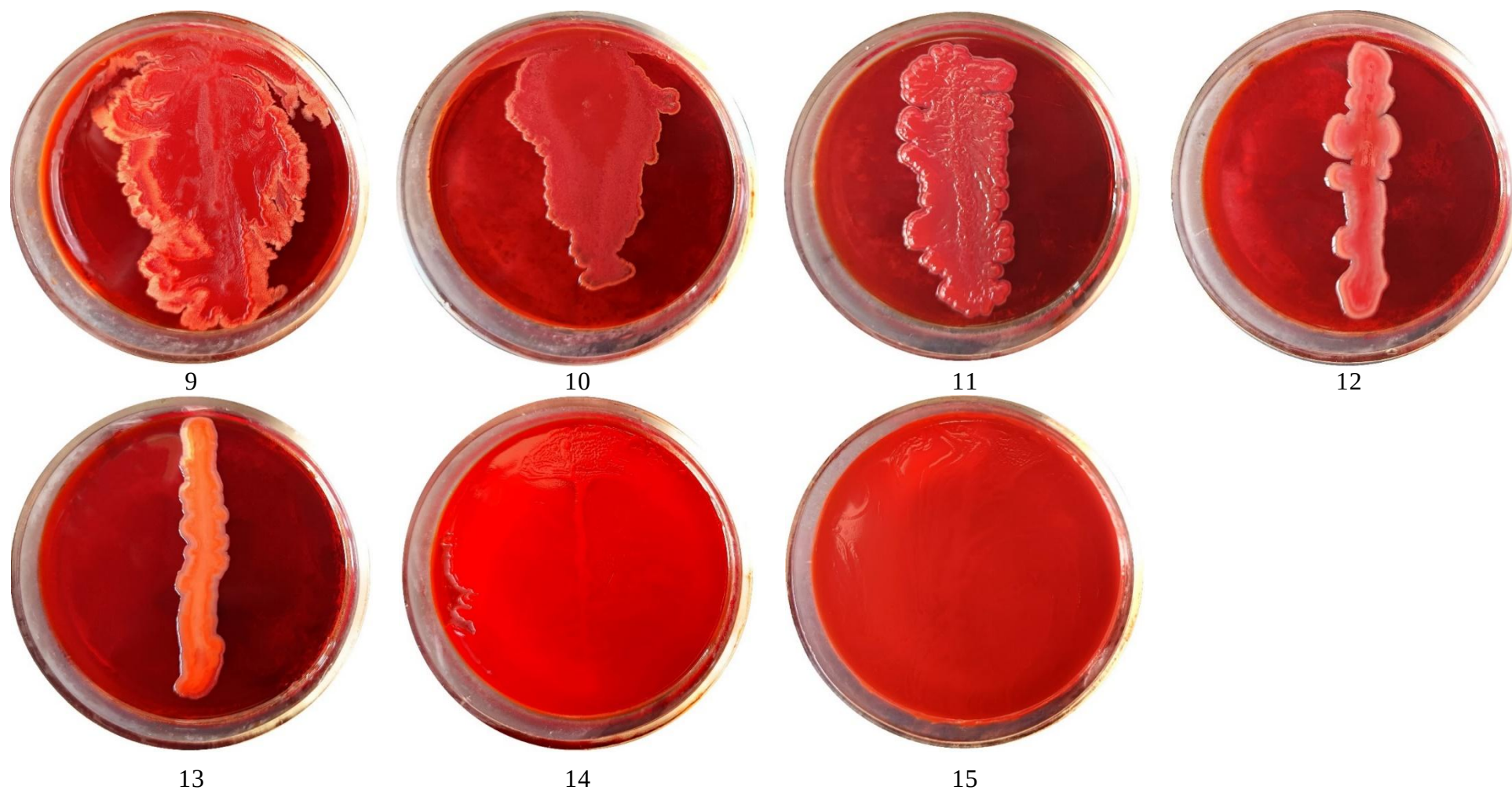
Рисунок 3.2.4 – Рост исследуемых микроорганизмов на питательной среде, содержащей труднорастворимый

источник цинка



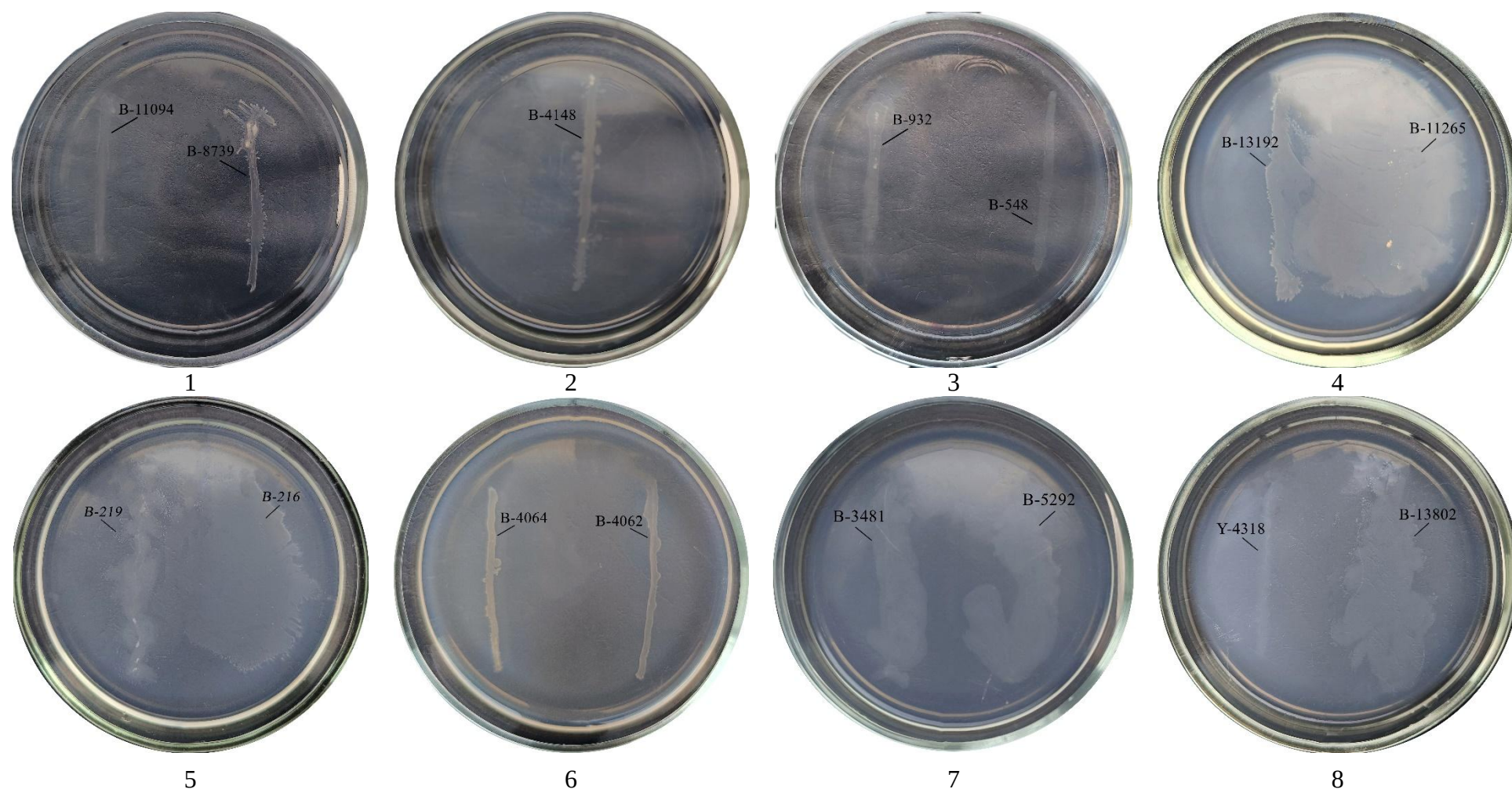
Примечание – 1 – *Azospirillum brasilense* B-11094; 2 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 3 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; 4 – *Azotobacter vinelandii* B-932; 5 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; 6 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; 7 – *Ensifer meliloti* B-219; 8 – *Ensifer mexicanus* B-4064

Рисунок 3.2.5 – Анализ способности штаммов образовывать биопленки (часть 1)



Примечание – 9 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 10 – *Pantoea ananatis* B-5292; 11 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 12 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; 13 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; 14 – *Rhizobium tropici* B-216; 15 – *Zygorhizula dagestanica* Y-4318

Рисунок 3.2.6 – Анализ способности штаммов образовывать биопленки (часть 2)



Примечание – 1 – *Azospirillum brasilense* B-11094 и *Azotobacter chroococcum* B-8739; 2 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 3 – *Azotobacter vinelandii* B-932 и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 4 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 и *Bacillus aryabhatai* B-13192; 5 – *Ensifer meliloti* B-219 и *Rhizobium tropici* B-216; 6 – *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 7 – *Pantoea ananatis* B-5292 и *Pseudomonas koreensis* B-3481; 8 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 и *Zygorhizobium dageshanense* Y-4318

Рисунок 3.2.7 – Рост исследуемых микроорганизмов на питательной среде для анализа способности к производству

АЦК–деаминазы

Исследования показали, что 4 исследуемых штамма обладали способностью солибилизировать цинк. К данным штаммам относили *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pantoea ananatis* B-5292, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802. Два штамма продемонстрировали способность к образованию биопленок: *Bacillus aryabhatai* B-13192 и *Ensifer meliloti* B-219. В контексте ростостимулирующих ризобактерий данное свойство может способствовать закреплению микроорганизмов на поверхности корней, то есть устойчивой колонизации ризосферы. Все исследуемые штаммы обладали способностью к синтезу АЦК-деаминазы.

На следующем этапе исследования оценили антагонистическую активность штаммов в отношении фитопатогенов (*Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006, *Erwinia rhapontici* B-9292, *Xanthomonas campestris* B-4102). Результаты представлены в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1 – Результаты исследования антагонистической активности исследуемых штаммов в отношении фитопатогенов

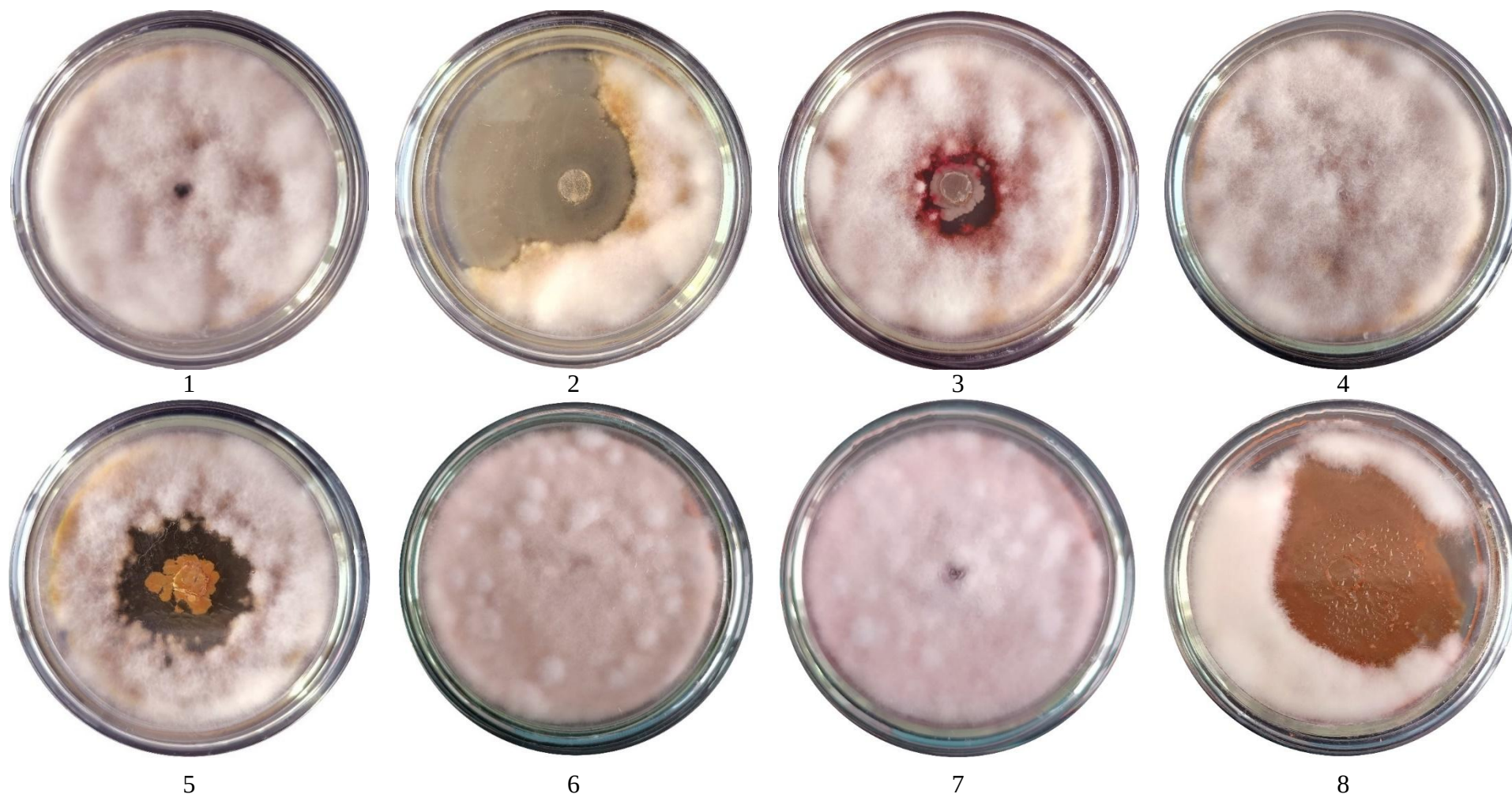
| Исследуемый штамм                            | Антагонистическая активность, мм     |                                       |                                   |                                     |                                         |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
|                                              | <i>Fusarium graminearum</i><br>F-877 | <i>Bipolaris sorokiniana</i><br>F-529 | <i>Botrytis cinerea</i><br>F-1006 | <i>Erwinia rhapontici</i><br>B-9292 | <i>Xanthomonas campestris</i><br>B-4102 |
| <i>Azospirillum brasilense</i><br>B-11094    | 67±3                                 | 35±1                                  | 40±2                              | 0                                   | 95±4                                    |
| <i>Azotobacter chroococcum</i><br>B-4148     | 25±1                                 | 37±1                                  | 37±1                              | 75±3                                | 60±3                                    |
| <i>Azotobacter chroococcum</i><br>B-8739     | 0                                    | 0                                     | 0                                 | 0                                   | 0                                       |
| <i>Azotobacter vinelandii</i><br>B-932       | 42±3                                 | 95±6                                  | 95±3                              | 20±1                                | 66±3                                    |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i><br>B-11265 | 0                                    | 85±4                                  | 0                                 | 17±1                                | 0                                       |
| <i>Bacillus aryabhatai</i><br>B-13192        | 0                                    | 0                                     | 0                                 | 19±1                                | 0                                       |
| <i>Ensifer meliloti</i> B-219                | 67±2                                 | 65±3                                  | 55±2                              | 23±1                                | 95±2                                    |
| <i>Ensifer mexicanus</i><br>B-4064           | 90±5                                 | 95±4                                  | 25±1                              | 0                                   | 77±3                                    |
| <i>Mesorhizobium mediterraneum</i> B-4062    | 92±4                                 | 75±4                                  | 16±1                              | 0                                   | 95±6                                    |
| <i>Pantoea ananatis</i> B-5292               | 65±4                                 | 75±3                                  | 18±1                              | 65±3                                | 62±3                                    |

## Продолжение таблицы 3.2.1

| Исследуемый штамм                                                     | Антагонистическая активность, мм         |                                           |                                       |                                         |                                             |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|
|                                                                       | <i>Fusarium<br/>graminearum</i><br>F-877 | <i>Bipolaris<br/>sorokiniana</i><br>F-529 | <i>Botrytis<br/>cinerea</i><br>F-1006 | <i>Erwinia<br/>rhapontici</i><br>B-9292 | <i>Xanthomonas<br/>campestris</i><br>B-4102 |
| <i>Pseudomonas<br/>chlororaphis</i> subsp.<br><i>aurantiaca</i> B-548 | 62±3                                     | 95±5                                      | 95±3                                  | 0                                       | 41±2                                        |
| <i>Pseudomonas koreensis</i><br>B-3481                                | 0                                        | 0                                         | 0                                     | 28±2                                    | 0                                           |
| <i>Pseudomonas<br/>plecoglossida</i> B-13802                          | 0                                        | 0                                         | 0                                     | 22±1                                    | 65±2                                        |
| <i>Rhizobium tropici</i> B-216                                        | 95±2                                     | 72±5                                      | 40±2                                  | 45±2                                    | 95±4                                        |
| <i>Zygorhiza dageshanica</i><br>Y-4318                                | 0                                        | 77±3                                      | 0                                     | 40±4                                    | 52±3                                        |

Антагонистическая активность в отношении *Fusarium graminearum* F-877 (рисунки 3.2.8 и 3.2.9) выявлена у 9 из 15 исследованных штаммов. Диапазон варьировался от 25±1 до 95±2 мм. Наиболее выраженное ингибирование роста фитопатогена отмечено у *Rhizobium tropici* B-216 (95±2 мм). Близкие значения продемонстрировали *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 и *Ensifer mexicanus* B-4064, зоны ингибирования составили 92±4 и 90±5 мм соответственно.

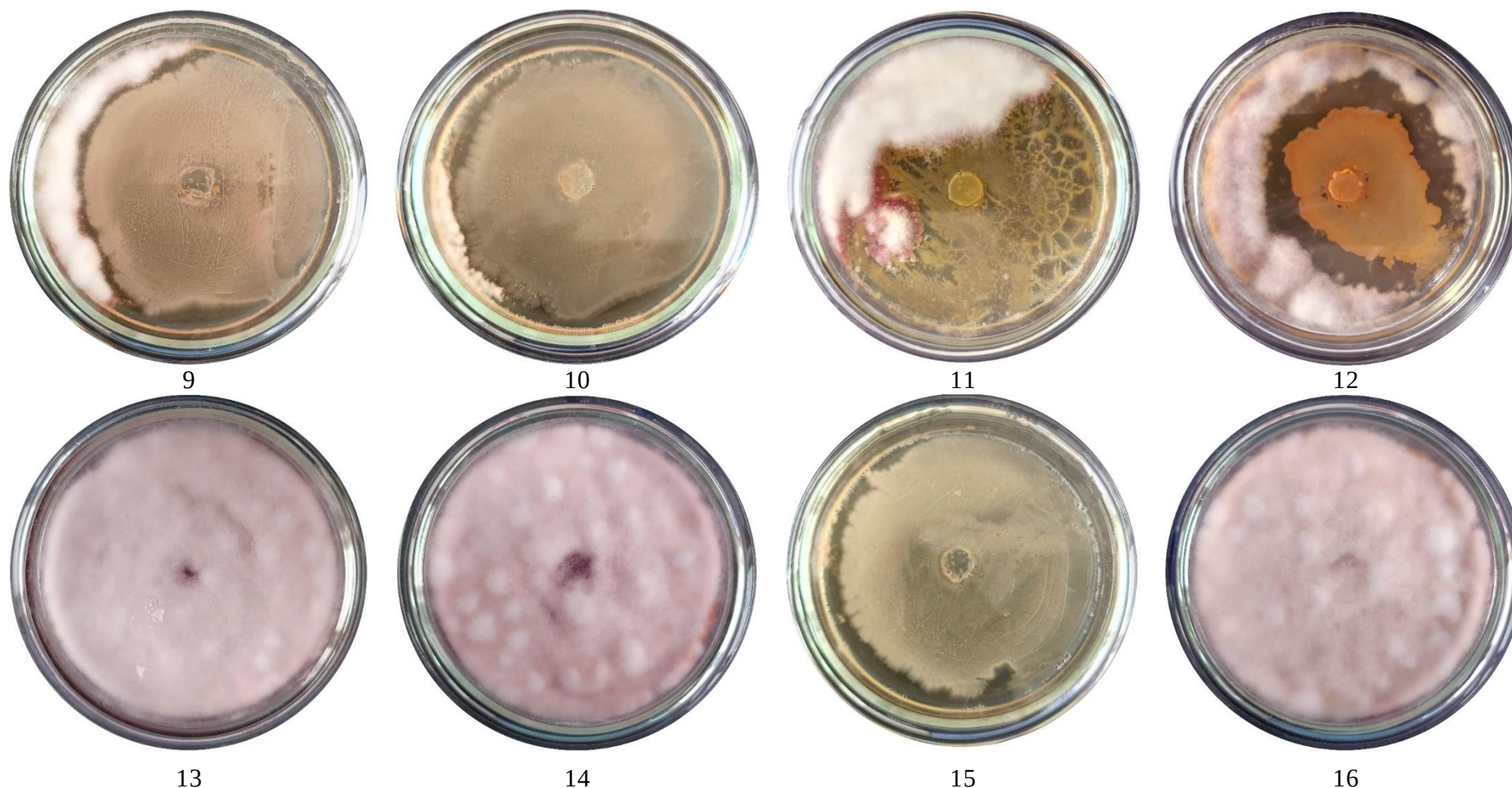
Высокую антагонистическую активность в отношении данного фитопатогена проявили штаммы *Azospirillum brasilense* B-11094, *Ensifer meliloti* B-219, а также штамм *Pantoea ananatis* B-5292 и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548. Умеренное подавление роста *F. graminearum* отмечено у *Azotobacter vinelandii* B-932, тогда как минимальная активность среди положительных вариантов зарегистрирована у *Azotobacter chroococcum* B-4148. Штаммы *Azotobacter chroococcum* B-8739, *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, *Bacillus aryabhattai* B-13192, *Pseudomonas koreensis* B-3481, *Pseudomonas plecoglossida* B-13802 и *Zygorhiza dageshanica* Y-4318 не проявили антагонистического действия в отношении *Fusarium graminearum* F-877.



Примечание – 1 – контроль; 2 – *Azospirillum brasilense* B-11094; 3 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 4 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; 5 – *Azotobacter vinelandii* B-932; 6 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; 7 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; 8 – *Ensifer meliloti* B-219

Рисунок 3.2.8 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении

*Fusarium graminearum* F-877 (часть 1)



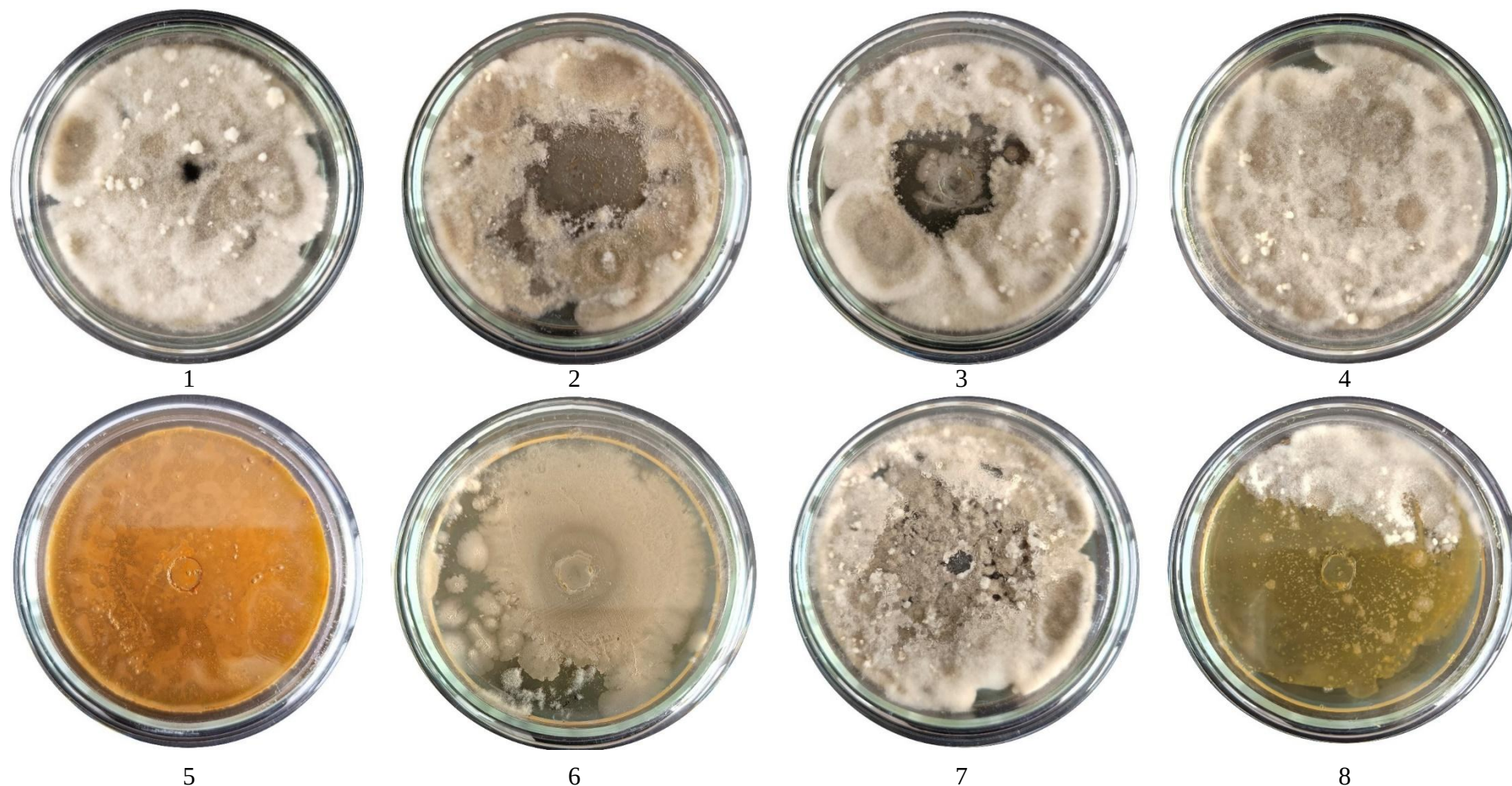
Примечание – 9 – *Ensifer mexicanus* B-4064; 10 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 11 – *Pantoea ananatis* B-5292; 12 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 13 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; 14 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; 15 – *Rhizobium tropici* B-216; 16 – *Zygorhiza dagestanica* Y-4318

Рисунок 3.2.9 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении

*Fusarium graminearum* F-877 (часть 2)

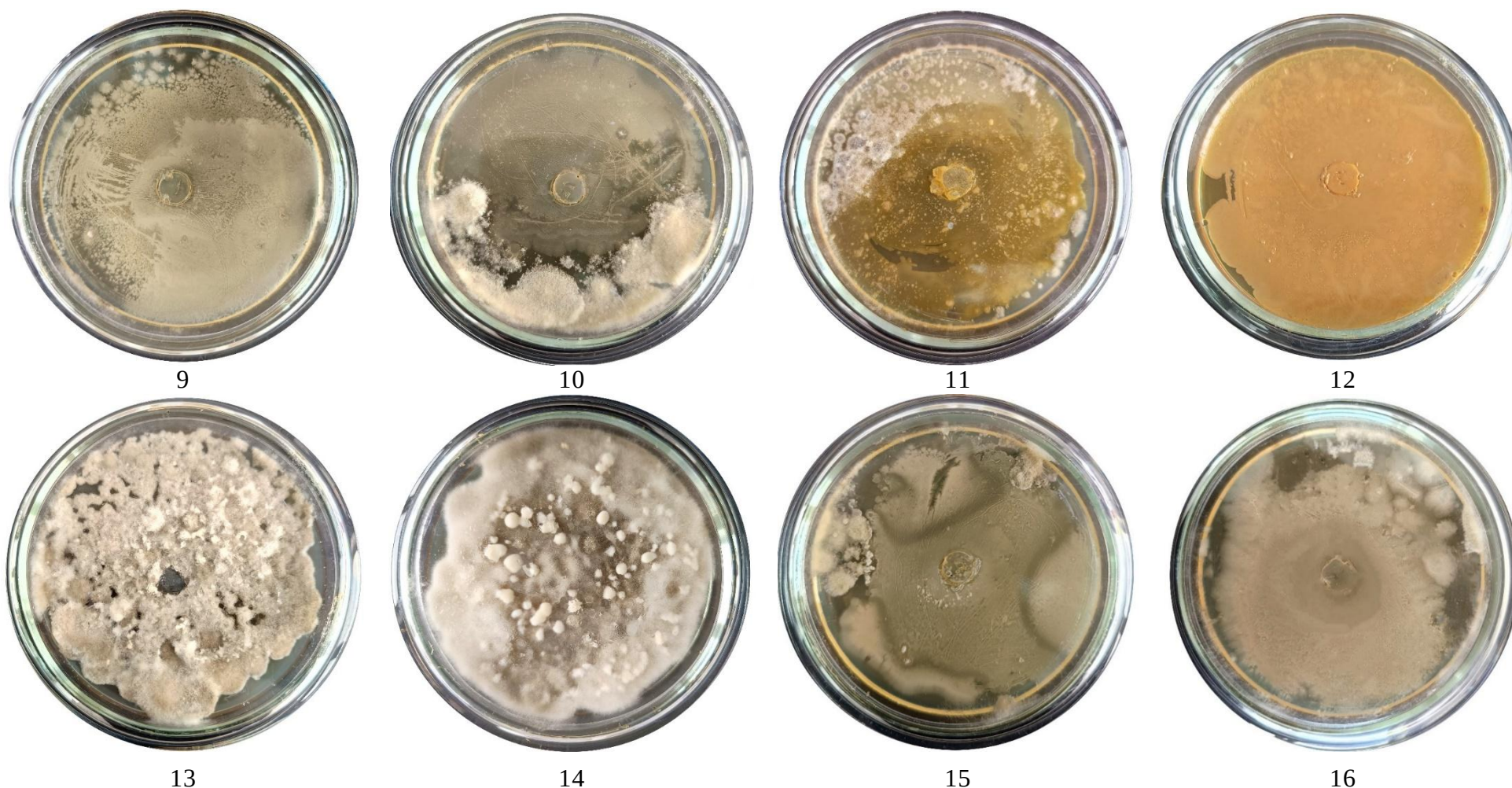
Фитопатоген *Bipolaris sorokiniana* F-529 (рисунки 3.2.10 и 3.2.11) характеризовался высокой чувствительностью к исследуемым штаммам. Зоны ингибирования зарегистрированы у 11 из 15 культур. Максимальная антагонистическая активность установлена у трех штаммов: *Azotobacter vinelandii* B-932, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548. Во всех трех случаях зона ингибирования достигала 95 мм и составляла соответственно  $95 \pm 6$ ,  $95 \pm 4$  и  $95 \pm 5$  мм. Высокую активность также проявил штамм *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, для которого зона подавления составила  $85 \pm 4$  мм. Значительное ингибирующее действие характерно также для штаммов: *Zygorhizoctonia dactylophila* Y-4318 ( $77 \pm 3$  мм), *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 ( $75 \pm 4$  мм), *Pantoea ananatis* B-5292 ( $75 \pm 3$  мм) и *Rhizobium tropici* B-216 ( $72 \pm 5$  мм). Средний уровень активности отмечен у *Ensifer meliloti* B-219. Зона ингибирования *Bipolaris sorokiniana* F-529 при исследовании данного штамма составляла  $65 \pm 3$  мм. Не проявили антагонистическую активность в отношении *B. sorokiniana* штаммы *Azotobacter chroococcum* B-8739, *Bacillus aryabhattai* B-13192, *Pseudomonas koreensis* B-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802.

В отношении *Botrytis cinerea* F-1006 (рисунки 3.2.12 и 3.2.13) антагонистическая активность исследуемых штаммов носила более дифференцированный характер. Зоны ингибирования выявлены у 9 штаммов, однако высокие значения отмечались только у отдельных культур. Наиболее выраженное ингибирование фитопатогена наблюдали у *Azotobacter vinelandii* B-932 и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548. Для данных штаммов зона ингибирования составила  $95 \pm 3$  мм. Низкая антагонистическая активность характерна для *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pantoea ananatis* B-5292 и *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062, зоны ингибирования составили  $25 \pm 1$ ,  $18 \pm 1$  и  $16 \pm 1$  мм соответственно. Антагонистическая активность отсутствовала у *Azotobacter chroococcum* B-8739, *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, *Bacillus aryabhattai* B-13192, *Pseudomonas koreensis* B-3481, *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802, а также *Zygorhizoctonia dactylophila* Y-4318.



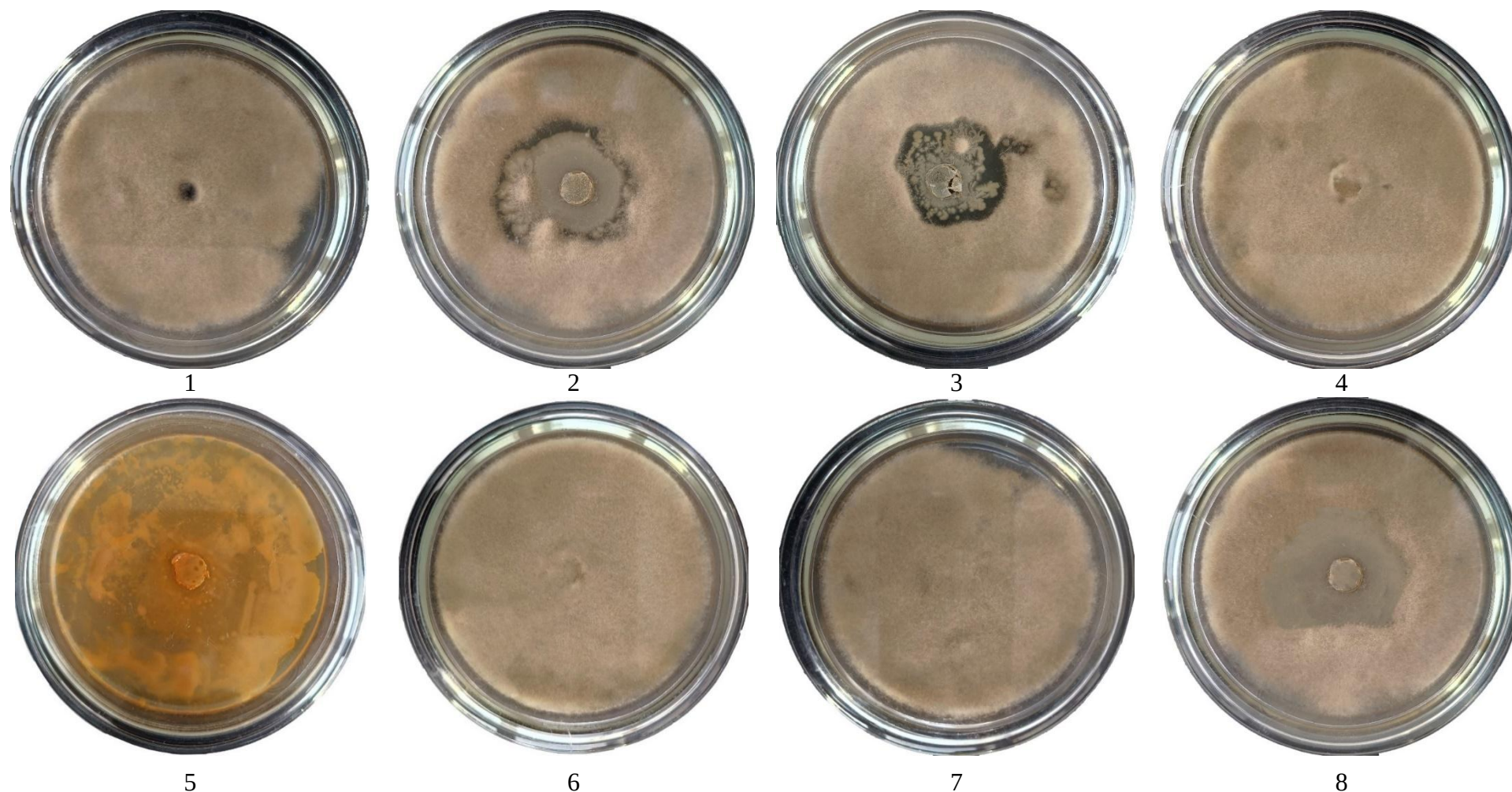
Примечание – 1 – контроль; 2 – *Azospirillum brasilense* B-11094; 3 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 4 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; 5 – *Azotobacter vinelandii* B-932; 6 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; 7 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; 8 – *Ensifer meliloti* B-219

Рисунок 3.2.10 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении *Bipolaris sorokiniana* F-529 (часть 1)



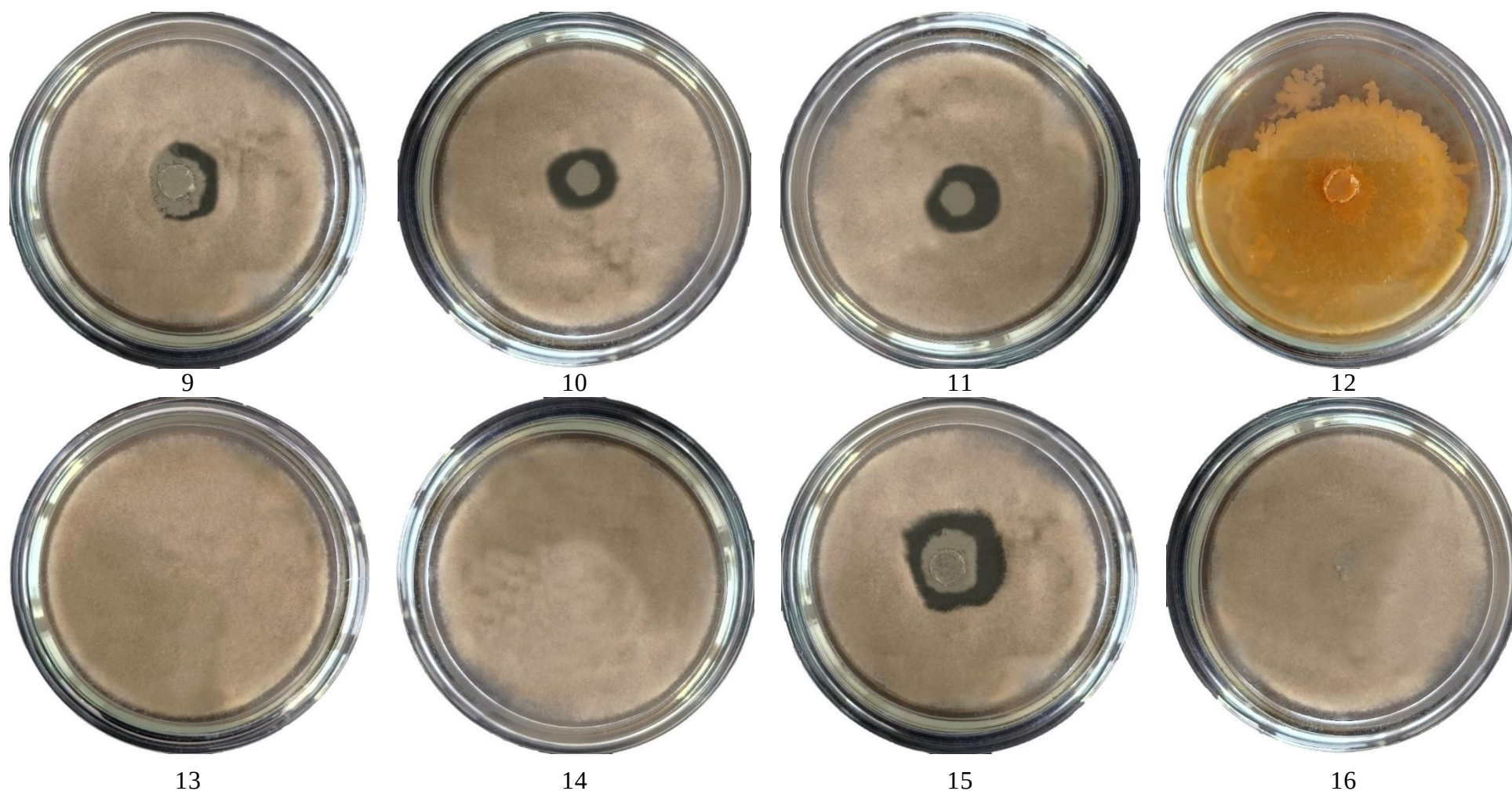
Примечание – 9 – *Ensifer mexicanus* B-4064; 10 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 11 – *Pantoea ananatis* B-5292; 12 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 13 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; 14 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; 15 – *Rhizobium tropici* B-216; 16 – *Zygorhizoplasma dagestanica* Y-4318

Рисунок 3.2.11 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении *Bipolaris sorokiniana* F-529 (часть 2)



Примечание – 1 – контроль; 2 – *Azospirillum brasilense* B-11094; 3 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 4 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; 5 – *Azotobacter vinelandii* B-932; 6 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; 7 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; 8 – *Ensifer meliloti* B-219

Рисунок 3.2.12 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении *Botrytis cinerea* F-1006 (часть 1)



Примечание – 9 – *Ensifer mexicanus* B-4064; 10 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 11 – *Pantoea ananatis* B-5292; 12 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 13 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; 14 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; 15 – *Rhizobium tropici* B-216; 16 – *Zygorhiza dagestanica* Y-4318

Рисунок 3.2.13 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении *Botrytis cinerea* F-1006 (часть 2)

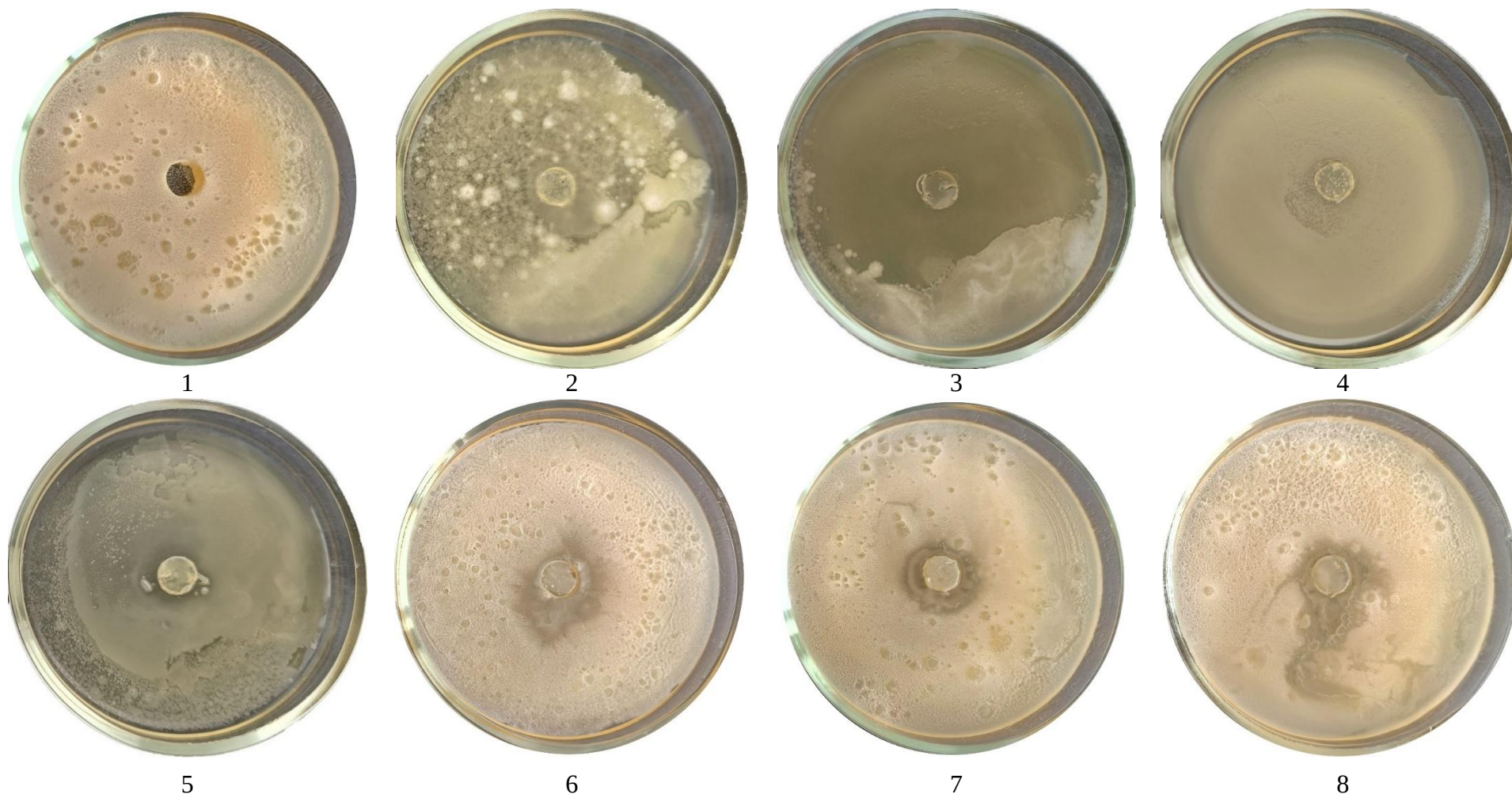
Антагонистическая активность в отношении фитопатогенной бактерии *Erwinia rhapontici* B-9292 установлена у 10 из 15 изучаемых штаммов (рисунки 3.2.14 и 3.2.15). Тем не менее, несмотря на значительную долю активных изолятов, размеры зон ингибирования в большинстве случаев оказались меньше, чем при подавлении грибных фитопатогенов.

Наиболее выраженная способность к подавлению роста *E. rhapontici* B-9292 выявлена у *Azotobacter chroococcum* B-4148, диаметр зоны ингибирования которого составил  $75 \pm 3$  мм; данный штамм является наиболее перспективным кандидатом для дальнейших исследований в области биологического контроля указанного патогена. Высокой антагонистической активностью характеризовался штамм *Pantoea ananatis* B-5292 ( $65 \pm 3$  мм).

У штаммов *Azospirillum brasilense* B-11094, *Azotobacter chroococcum* B-8739, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 и *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 антагонистическая активность в отношении *E. rhapontici* не выявлена.

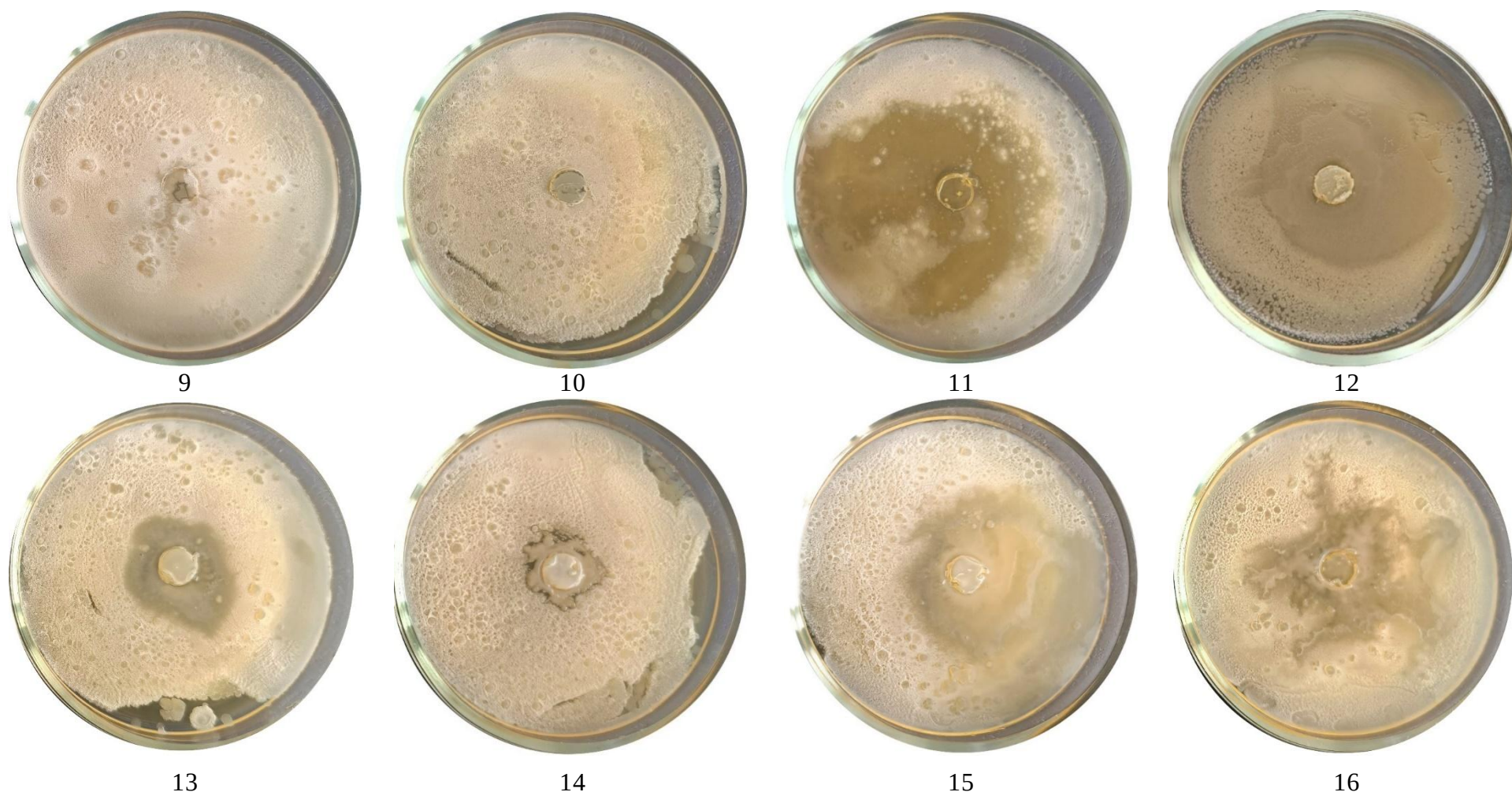
Фитопатогенный штамм *Xanthomonas campestris* B-4102 продемонстрировал высокую чувствительность к действию метаболитов исследуемых микроорганизмов (рисунки 3.2.16 и 3.2.17). Антагонистическая активность в отношении данного патогена была выявлена у 11 из 15 протестированных культур, при этом максимальные диаметры зон ингибирования достигали 95 мм.

Не проявили активности в отношении исследуемого фитопатогена штаммы *Azotobacter chroococcum* B-8739, *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, *Bacillus aryabhattai* B-13192 и *Pseudomonas koreensis* B-3481.



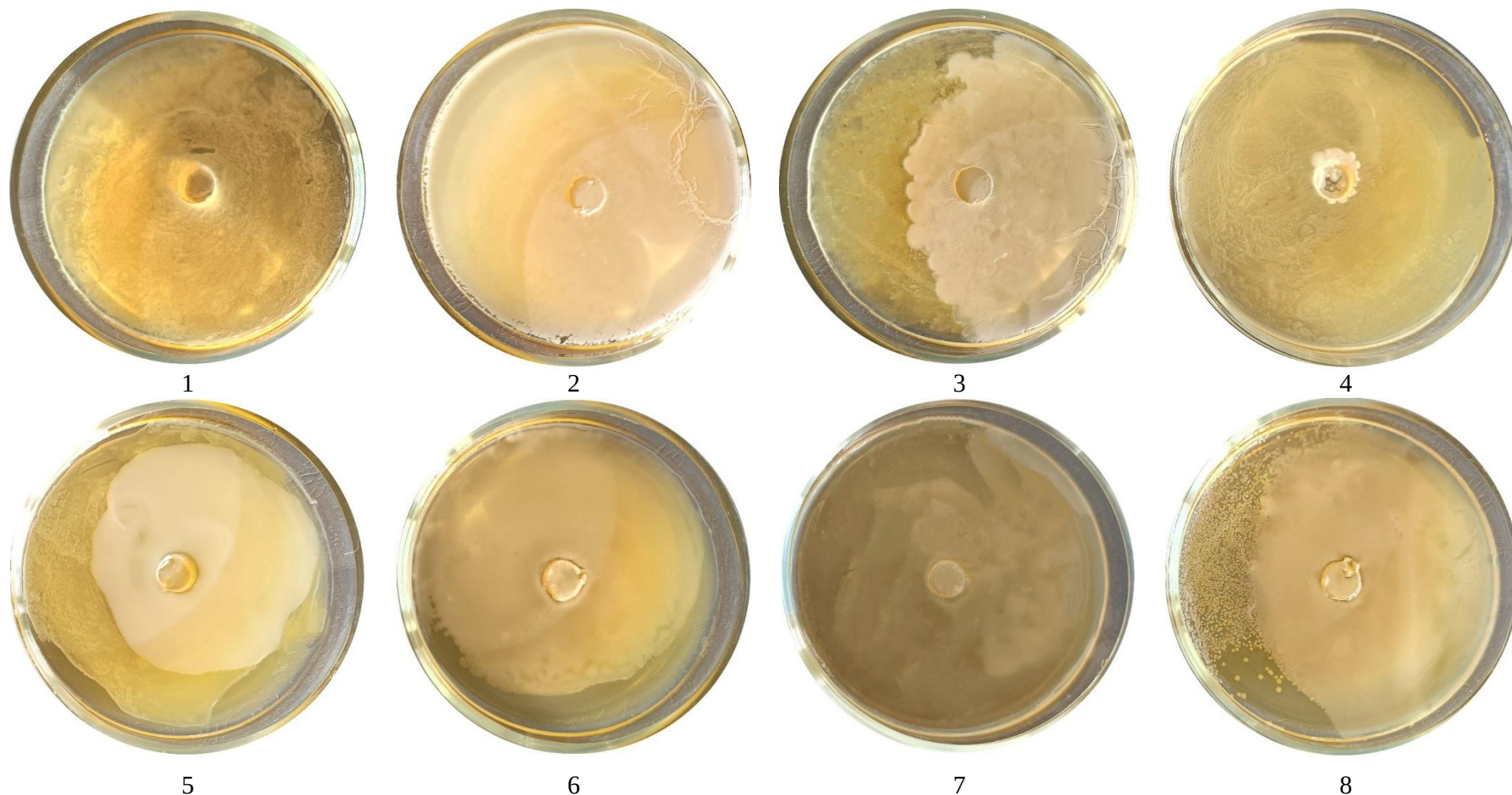
Примечание – 1 – контроль; 2 – *Azospirillum brasilense* B-11094; 3 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 4 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; 5 – *Azotobacter vinelandii* B-932; 6 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; 7 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; 8 – *Ensifer meliloti* B-219

Рисунок 3.2.14 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении *Erwinia rhapontici* B-9292 (часть 1)



Примечание – 9 – *Ensifer mexicanus* B-4064; 10 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 11 – *Pantoea ananatis* B-5292; 12 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 13 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; 14 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; 15 – *Rhizobium tropici* B-216; 16 – *Zygorhizobium daghestanicum* Y-4318

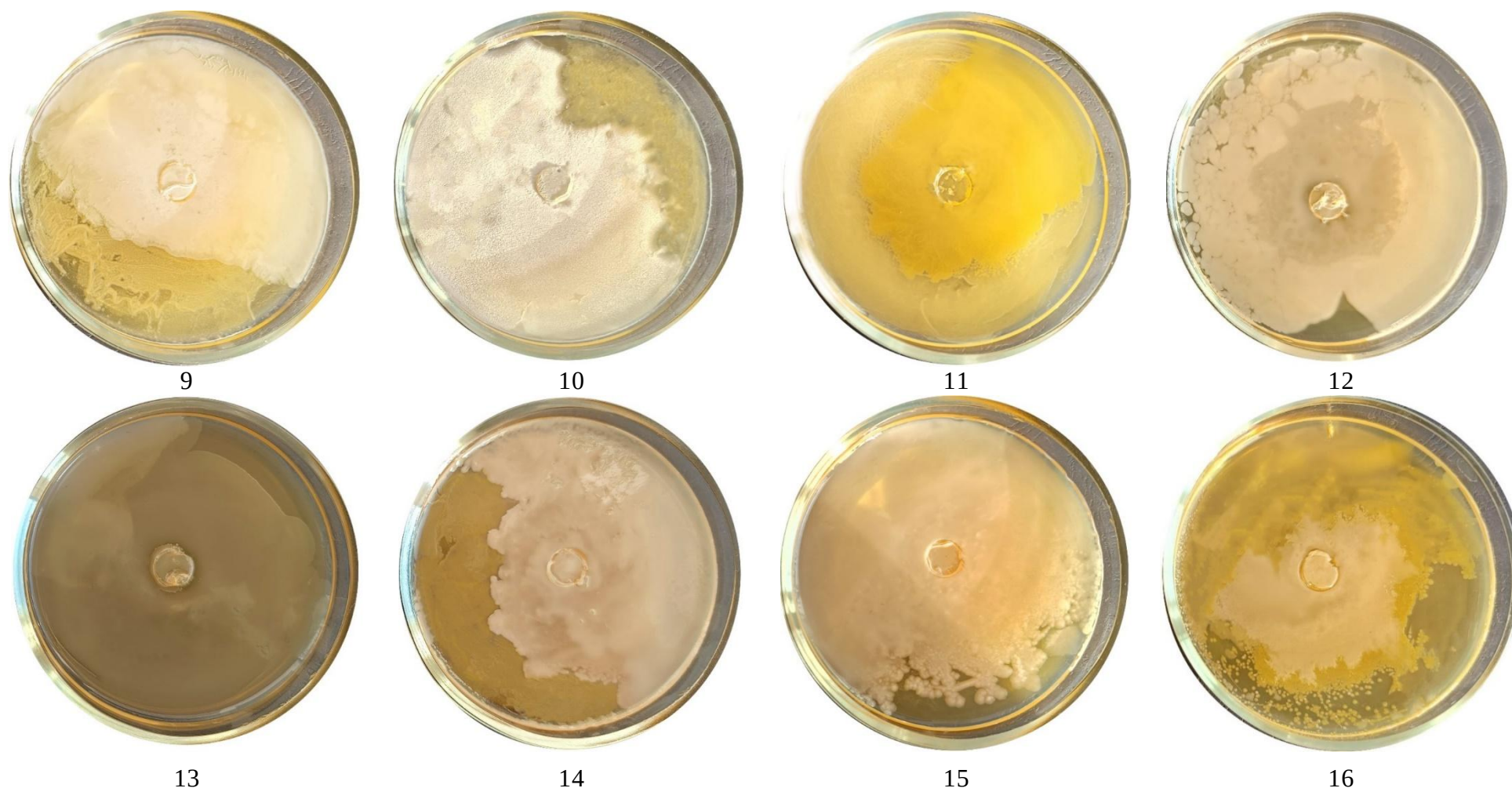
Рисунок 3.2.15 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении *Erwinia raphanistrum* B-9292 (часть 2)



Примечание – 1 – контроль; 2 – *Azospirillum brasilense* B-11094; 3 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; 4 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; 5 – *Azotobacter vinelandii* B-932; 6 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; 7 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; 8 – *Ensifer meliloti* B-219

Рисунок 3.2.16 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении

*Xanthomonas campestris* B-4102 (часть 1)



Примечание – 9 – *Ensifer mexicanus* B-4064; 10 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; 11 – *Pantoea ananatis* B-5292; 12 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; 13 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; 14 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; 15 – *Rhizobium tropici* B-216; 16 – *Zygorhiza dagestanica* Y-4318

Рисунок 3.2.17 – Антагонистическая активность исследуемых штаммов в отношении

*Xanthomonas campestris* B-4102 (часть 2)

Результаты ранжирования ростостимулирующих и антагонистических свойств представлены в таблицах 3.2.2 и 3.2.3. Ранжирование исследуемых штаммов проводили на основании совокупной оценки ростостимулирующих показателей и антагонистической активности в отношении фитопатогенных микроорганизмов. Такой подход позволил не ограничиваться анализом отдельных функциональных признаков, а осуществить оценку биологического потенциала штаммов с учетом их способности одновременно участвовать в улучшении минерального питания растений, синтезе физиологически активных соединений, стресс-протекции и подавлении фитопатогенов.

По результатам ранжирования ростостимулирующих свойств было установлено, что наиболее высокий показатель среди исследуемых культур имели штаммы *Pseudomonas koreensis* B-3481 (ранг 3,11) и *Ensifer mexicanus* B-4064 (ранг 3,10). К числу штаммов с высоким рангом ростостимулирующих показателей также относились *Ensifer meliloti* B-219 (ранг 2,68), *Azospirillum brasilense* B-11094 (ранг 2,49), *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 (ранг 2,42), *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265 (ранг 2,41), *Pantoea ananatis* B-5292 (ранг 2,28), а также *Azotobacter chroococcum* B-4148 (ранг 2,25).

Оценка антагонистической активности продемонстрировала другую структуру распределения штаммов. Наиболее высокий ранг по данному блоку установлен у *Rhizobium tropici* B-216 – 3,78 и *Azotobacter vinelandii* B-932 – 3,71. К группе штаммов с высоким антагонистическим потенциалом также относились *Ensifer meliloti* B-219 (ранг 3,39), *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 (ранг 3,37), *Ensifer mexicanus* B-4064 (ранг 3,32) и *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 (ранг 3,05). Указанные штаммы характеризовались широким спектром ингибирующего действия.

Таблица 3.2.2 – Ранжирование ростостимулирующих показателей исследуемых штаммов

| Штамм   | Балл |                 |   |    |    |     |    |     |    | Ранг |                 |      |      |      |      |      |      |      | Общий ранг |
|---------|------|-----------------|---|----|----|-----|----|-----|----|------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------------|
|         | N    | NH <sub>3</sub> | P | Zn | БП | АЦК | СД | ИУК | ГК | N    | NH <sub>3</sub> | P    | Zn   | БП   | АЦК  | СД   | ИУК  | ГК   |            |
| B-11094 | 3    | 2               | 3 | 0  | 0  | 5   | 5  | 3   | 4  | 0    | 0,4             | 0,75 | 0    | 0    | 0,05 | 1,15 | 0,06 | 0,08 | 2,49       |
| B-4148  | 3    | 1               | 4 | 0  | 0  | 5   | 4  | 1   | 3  | 0    | 0,2             | 1    | 0    | 0    | 0,05 | 0,92 | 0,02 | 0,06 | 2,25       |
| B-8739  | 2    | 1               | 2 | 0  | 0  | 5   | 4  | 1   | 4  | 0    | 0,2             | 0,5  | 0    | 0    | 0,05 | 0,92 | 0,02 | 0,08 | 1,77       |
| B-932   | 3    | 1               | 1 | 0  | 0  | 5   | 3  | 2   | 4  | 0    | 0,2             | 0,25 | 0    | 0    | 0,05 | 0,69 | 0,04 | 0,08 | 1,31       |
| B-11265 | 1    | 4               | 3 | 0  | 0  | 5   | 3  | 3   | 3  | 0    | 0,8             | 0,75 | 0    | 0    | 0,05 | 0,69 | 0,06 | 0,06 | 2,41       |
| B-13192 | 3    | 3               | 3 | 0  | 5  | 5   | 2  | 2   | 3  | 0    | 0,6             | 0,75 | 0    | 0,05 | 0,05 | 0,46 | 0,04 | 0,06 | 2,01       |
| B-219   | 4    | 5               | 3 | 0  | 5  | 5   | 3  | 3   | 4  | 0    | 1               | 0,75 | 0    | 0,05 | 0,05 | 0,69 | 0,06 | 0,08 | 2,68       |
| B-4064  | 4    | 5               | 4 | 5  | 0  | 5   | 4  | 3   | 1  | 0    | 1               | 1    | 0,05 | 0    | 0,05 | 0,92 | 0,06 | 0,02 | 3,10       |
| B-4062  | 4    | 3               | 3 | 0  | 0  | 5   | 4  | 1   | 4  | 0    | 0,6             | 0,75 | 0    | 0    | 0,05 | 0,92 | 0,02 | 0,08 | 2,42       |
| B-5292  | 3    | 3               | 3 | 5  | 0  | 5   | 3  | 5   | 2  | 0    | 0,6             | 0,75 | 0,05 | 0    | 0,05 | 0,69 | 0,1  | 0,04 | 2,28       |
| B-548   | 1    | 2               | 2 | 5  | 0  | 5   | 4  | 3   | 4  | 0    | 0,4             | 0,5  | 0,05 | 0    | 0,05 | 0,92 | 0,06 | 0,08 | 2,06       |
| B-3481  | 5    | 5               | 5 | 0  | 0  | 5   | 3  | 1   | 5  | 0    | 1               | 1,25 | 0    | 0    | 0,05 | 0,69 | 0,02 | 0,1  | 3,11       |
| B-13802 | 3    | 5               | 2 | 5  | 0  | 5   | 2  | 1   | 2  | 0    | 1               | 0,5  | 0,05 | 0    | 0,05 | 0,46 | 0,02 | 0,04 | 2,12       |
| B-216   | 4    | 3               | 1 | 0  | 0  | 5   | 4  | 3   | 3  | 0    | 0,6             | 0,25 | 0    | 0    | 0,05 | 0,92 | 0,06 | 0,06 | 1,94       |
| Y-4318  | 4    | 3               | 2 | 0  | 0  | 5   | 3  | 1   | 3  | 0    | 0,6             | 0,5  | 0    | 0    | 0,05 | 0,69 | 0,02 | 0,06 | 1,92       |

Примечание – N – накопление общего азота; NH<sub>3</sub> – производство аммиака; P – солюбилизация фосфатов; Zn – солюбилизация цинка; БП – образование биопленок; АЦК – производство АЦК-деаминазы; СД – продуцирование сидерофоров; ИУК – продуцирование индолил-3-уксусной кислоты; ГК – продуцирование гиббереллиновой кислоты; B-11094 – *Azospirillum brasilense* B-11094; B-4148 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; B-8739 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; B-932 – *Azotobacter vinelandii* B-932; B-11265 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; B-13192 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; B-219 – *Ensifer meliloti* B-219; B-4064 – *Ensifer mexicanus* B-4064; B-4062 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; B-5292 – *Pantoea ananatis* B-5292; B-548 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; B-3481 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; B-13802 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; B-216 – *Rhizobium tropici* B-216; Y-4318 – *Zygorhiza dagestanica* Y-4318

Таблица 3.2.3 – Ранжирование антагонистической активности исследуемых штаммов

| Штамм   | Балл  |       |        |        |        | Ранг  |       |        |        |        | Общий ранг |
|---------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|------------|
|         | F-877 | F-529 | F-1006 | B-9292 | B-4102 | F-877 | F-529 | F-1006 | B-9292 | B-4102 |            |
| B-11094 | 4     | 2     | 2      | 0      | 5      | 0,88  | 0,44  | 0,44   | 0      | 0,85   | 2,61       |
| B-4148  | 2     | 2     | 2      | 4      | 3      | 0,44  | 0,44  | 0,44   | 0,68   | 0,51   | 2,51       |
| B-8739  | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0,00       |
| B-932   | 3     | 5     | 5      | 1      | 4      | 0,66  | 1,1   | 1,1    | 0,17   | 0,68   | 3,71       |
| B-11265 | 0     | 4     | 0      | 1      | 0      | 0     | 0,88  | 0      | 0,17   | 0      | 1,05       |
| B-13192 | 0     | 0     | 0      | 1      | 0      | 0     | 0     | 0      | 0,17   | 0      | 0,17       |
| B-219   | 4     | 3     | 3      | 2      | 5      | 0,88  | 0,66  | 0,66   | 0,34   | 0,85   | 3,39       |
| B-4064  | 5     | 5     | 2      | 0      | 4      | 1,1   | 1,1   | 0,44   | 0      | 0,68   | 3,32       |
| B-4062  | 5     | 4     | 1      | 0      | 5      | 1,1   | 0,88  | 0,22   | 0      | 0,85   | 3,05       |
| B-5292  | 3     | 4     | 1      | 3      | 3      | 0,66  | 0,88  | 0,22   | 0,51   | 0,51   | 2,78       |
| B-548   | 3     | 5     | 5      | 0      | 3      | 0,66  | 1,1   | 1,1    | 0      | 0,51   | 3,37       |
| B-3481  | 0     | 0     | 0      | 2      | 0      | 0     | 0     | 0      | 0,34   | 0      | 0,34       |
| B-13802 | 0     | 0     | 0      | 2      | 3      | 0     | 0     | 0      | 0,34   | 0,51   | 0,85       |
| B-216   | 5     | 4     | 2      | 3      | 5      | 1,1   | 0,88  | 0,44   | 0,51   | 0,85   | 3,78       |
| Y-4318  | 0     | 4     | 0      | 2      | 3      | 0     | 0,88  | 0      | 0,34   | 0,51   | 1,73       |

Примечание – F-877 – *Fusarium graminearum* F-877; F-529 – *Bipolaris sorokiniana* F-529; F-1006 – *Botrytis cinerea* F-1006; B-9292 – *Erwinia rhapontici* B-9292; B-4102 – *Xanthomonas campestris* B-4102; B-11094 – *Azospirillum brasilense* B-11094; B-4148 – *Azotobacter chroococcum* B-4148; B-8739 – *Azotobacter chroococcum* B-8739; B-932 – *Azotobacter vinelandii* B-932; B-11265 – *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265; B-13192 – *Bacillus aryabhattai* B-13192; B-219 – *Ensifer meliloti* B-219; B-4064 – *Ensifer mexicanus* B-4064; B-4062 – *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; B-5292 – *Pantoea ananatis* B-5292; B-548 – *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; B-3481 – *Pseudomonas koreensis* B-3481; B-13802 – *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802; B-216 – *Rhizobium tropici* B-216; Y-4318 – *Zygorhiza dagestanica* Y-4318

Общее ранжирование, представленное на рисунке 3.2.18, отражает суммарный вклад ростостимулирующих и антагонистических свойств.

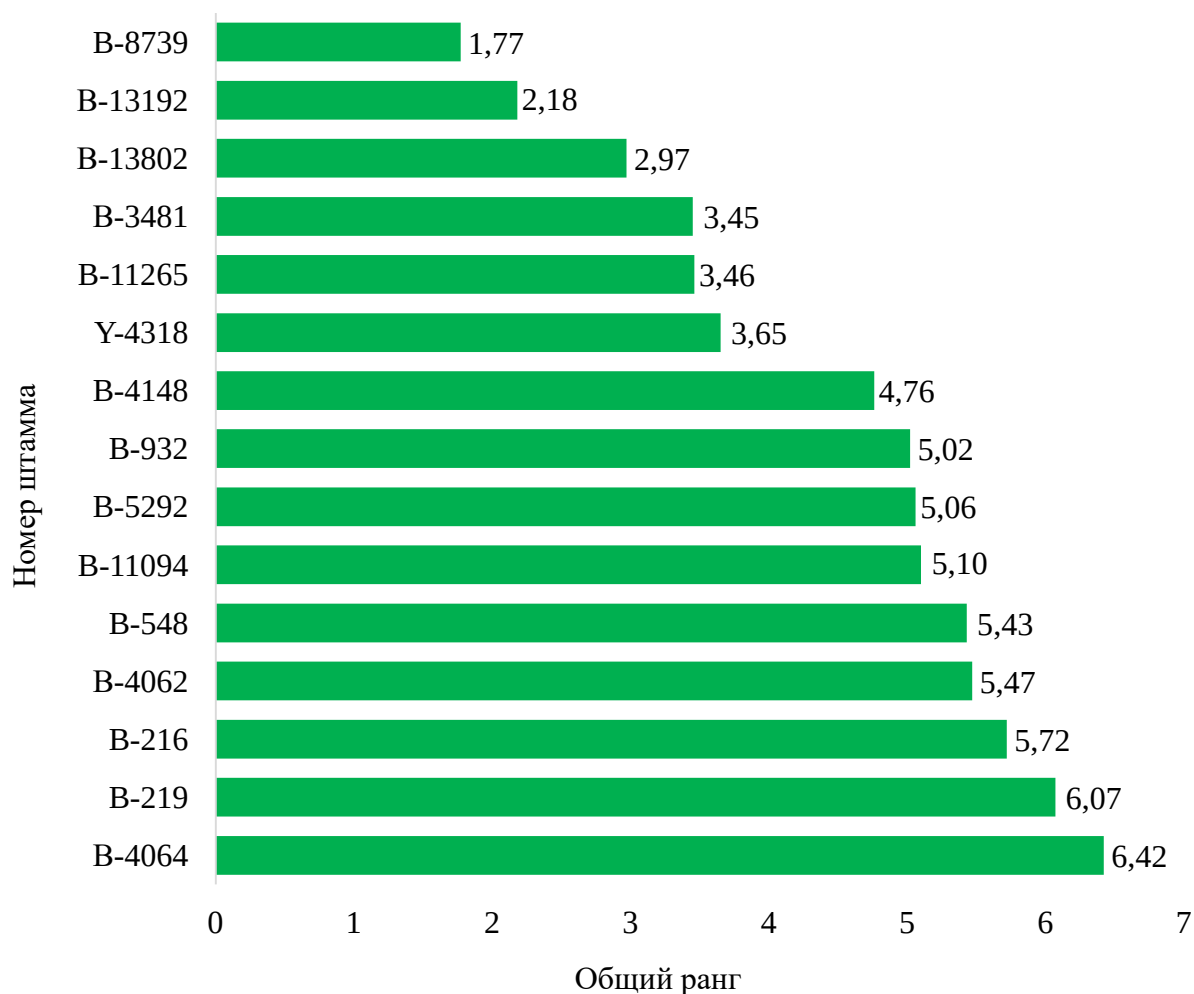


Рисунок 3.2.18 – Общий ранг исследуемых штаммов

Ранжирование позволило выделить восемь наиболее перспективных штаммов, общий ранг которых превышал 5,00: *Ensifer mexicanus* B-4064 (6,42), *Ensifer meliloti* B-219 (6,07), *Rhizobium tropici* B-216 (5,72), *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 (5,47), *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 (5,43), *Azospirillum brasilense* B-11094 (5,10), *Pantoea ananatis* B-5292 (5,06) и *Azotobacter vinelandii* B-932 (5,02).

### 3.3 Заключение по главе 3

Исследованы свойства отобранных бактерий: способность продуцировать вещества для стимулирования роста и развития зерновых культур, а именно пшеницы (индолил-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты, сидерофоров), солюбилизировать минеральные соединения почв (фосфаты и цинк), фиксировать атмосферный азот, образовывать биопленки, проявлять антагонистическую активность в отношении фитопатогенов полевых культур (*Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006, *Erwinia rhapontici* B-9292, *Xanthomonas campestris* B-4102); отобраны перспективные ростостимулирующие бактерии с максимальной активностью для дальнейшего конструирования бактериальных консорциумов [65].

Установлено, что наибольшей способностью накапливать общий азот на безазотистой среде (более 170 мкг/см<sup>3</sup>) обладали 5 штаммов: *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pseudomonas koreensis* B-3481, *Rhizobium tropici* B-216 и *Zygorhizula daegeonensis* Y-4318. Наибольшая способность (более 250 мкг/см<sup>3</sup>) к производству аммиака наблюдалась у 7 штаммов: *Azospirillum brasilense* B-11094, *Azotobacter vinelandii* B-932, *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548, *Pseudomonas koreensis* B-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802. Более 200 мкг/см<sup>3</sup> солюбилизировали фосфаты 6 микроорганизмов: *Azospirillum brasilense* B-11094, *Azotobacter chroococcum* B-4148, *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pantoea ananatis* B-5292 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802. У 4 штаммов обнаружена способность солюбилизировать цинк: *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pantoea ananatis* B-5292, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802. Способность к образованию биопленок продемонстрировали 2 штамма: *Bacillus aryabhattai* B-13192 и *Ensifer meliloti* B-219. Все исследованные штаммы обладали способностью к синтезу

АЦК-дезаминазы. Способностью продуцировать сидерофоры (более 50 %) обладали 3 штамма: *Azospirillum brasilense* B-11094, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062. Наибольшей способностью синтезировать индолил-3-уксусную кислоту (более 6,0 мкг/см<sup>3</sup>) обладали 6 штаммов: *Azospirillum brasilense* B-11094, *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Pantoea ananatis* B-5292, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Rhizobium tropici* B-216. Наибольшая способность (более 250 мкг/см<sup>3</sup>) к продуцированию гиббереллиновой кислоты наблюдалась у 8 штаммов: *Azospirillum brasilense* B-11094, *Azotobacter chroococcum* B-8739, *Azotobacter vinelandii* B-932, *Bacillus amyloliquefaciens* B-11265, *Ensifer meliloti* B-219, *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Pseudomonas koreensis* B-3481.

Высокими антагонистическими свойствами в отношении исследованных фитопатогенов (*Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006, *Erwinia rhapontici* B-9292 и *Xanthomonas campestris* B-4102) обладали штаммы: *Azotobacter chroococcum* B-4148, *Azotobacter vinelandii* B-932, *Ensifer meliloti* B-219, *Pantoea ananatis* B-5292 и *Rhizobium tropici* B-216.

По результатам ранжирования ростостимулирующих и антагонистических показателей отобраны восемь наиболее перспективных штаммов с общим рангом более 5,00: *Ensifer mexicanus* B-4064 – 6,42; *Ensifer meliloti* B-219 – 6,07; *Rhizobium tropici* B-216 – 5,72; *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062 – 5,47; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 – 5,43; *Azospirillum brasilense* B-11094 – 5,10; *Pantoea ananatis* B-5292 – 5,06 и *Azotobacter vinelandii* B-932 – 5,02.

## ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСОРЦИУМОВ РИЗОБАКТЕРИЙ

В главе представлена информация о конструировании консорциумов на основе отобранных штаммов бактерий, а также комплексная оценка их свойств.

### 4.1 Конструирование микробных консорциумов

Для составления консорциумов необходимо провести анализ биосовместимости перспективных штаммов (таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1 – Биосовместимость перспективных штаммов

| Штамм   | Штамм   |       |       |        |        |        |       |       |
|---------|---------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|-------|
|         | В-11094 | В-932 | В-219 | В-4064 | В-4062 | В-5292 | В-548 | В-216 |
| В-11094 |         |       |       |        |        |        |       |       |
| В-932   | –       |       |       |        |        |        |       |       |
| В-219   | –       | –     |       |        |        |        |       |       |
| В-4064  | –       | –     | +     |        |        |        |       |       |
| В-4062  | –       | –     | –     | –      |        |        |       |       |
| В-5292  | –       | +     | –     | –      | –      |        |       |       |
| В-548   | +       | +     | +     | –      | –      | +      |       |       |
| В-216   | –       | +     | +     | +      | –      | +      | –     |       |

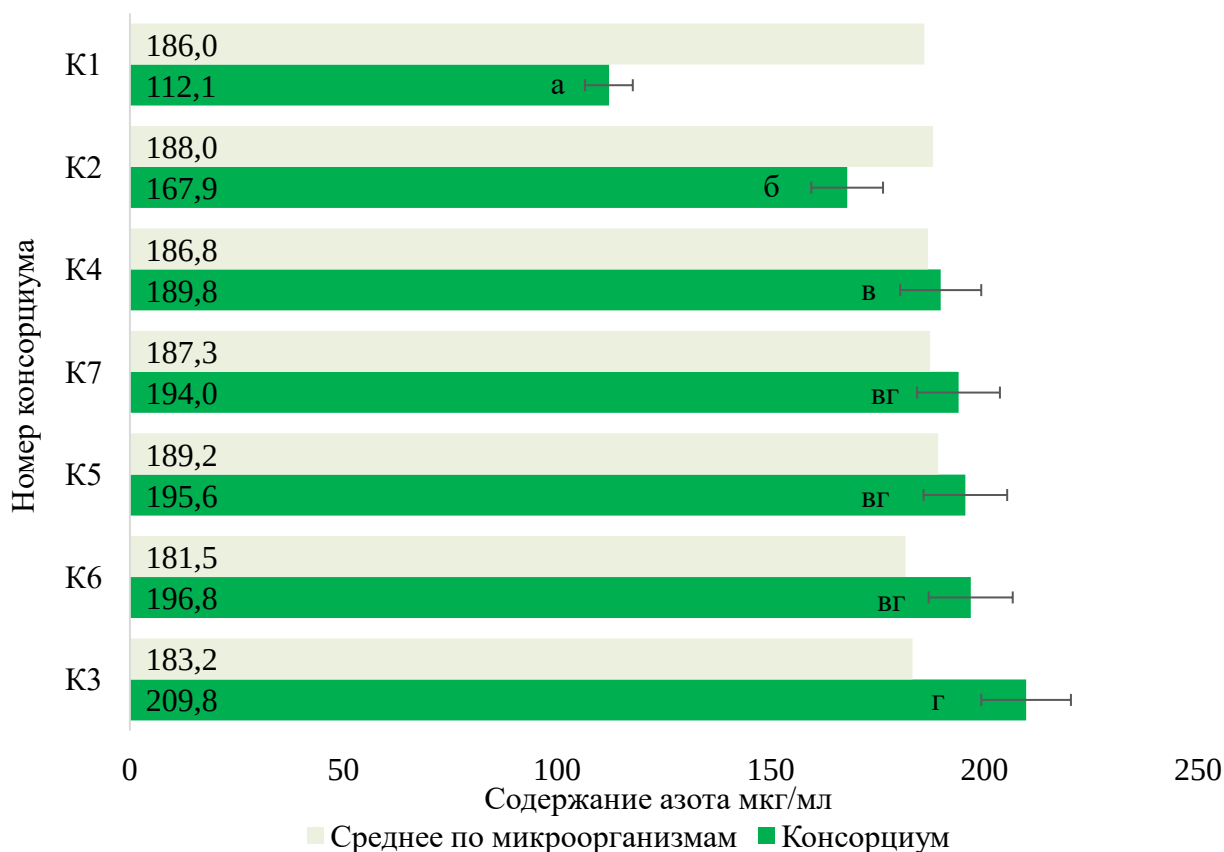
Примечание: В-11094 – *Azospirillum brasilense* В-11094; В-932 – *Azotobacter vinelandii* В-932; В-219 – *Ensifer meliloti* В-219; В-4064 – *Ensifer mexicanus* В-4064; В-4062 – *Mesorhizobium mediterraneum* В-4062; В-5292 – *Pantoea ananatis* В-5292; В-548 – *Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca* В-548; В-216 – *Rhizobium tropici* В-216.

По результатам анализа биосовместимости и на основе ростостимулирующей и антагонистической активностей для составления консорциумов выбраны следующие штаммы: *Ensifer meliloti* В-219, *Ensifer mexicanus* В-4064 и *Rhizobium tropici* В-216. Соотношение штаммов в сконструированных консорциумах представлено в таблице 4.1.2.

Таблица 4.1.2 – Соотношение штаммов в сконструированных консорциумах

| Консорциум | Штамм                         |                                 |                                |
|------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|            | <i>Ensifer meliloti</i> B-219 | <i>Ensifer mexicanus</i> B-4064 | <i>Rhizobium tropici</i> B-216 |
| K1         | 1                             | 1                               | 1                              |
| K2         | 1                             | 1                               | 2                              |
| K3         | 1                             | 2                               | 1                              |
| K4         | 1                             | 1                               | 3                              |
| K5         | 2                             | 1                               | 1                              |
| K6         | 1                             | 3                               | 1                              |
| K7         | 3                             | 1                               | 1                              |

Результаты исследования способности консорциумов накапливать общий азот на безазотистой питательной среде представлены на рисунке 4.1.1.



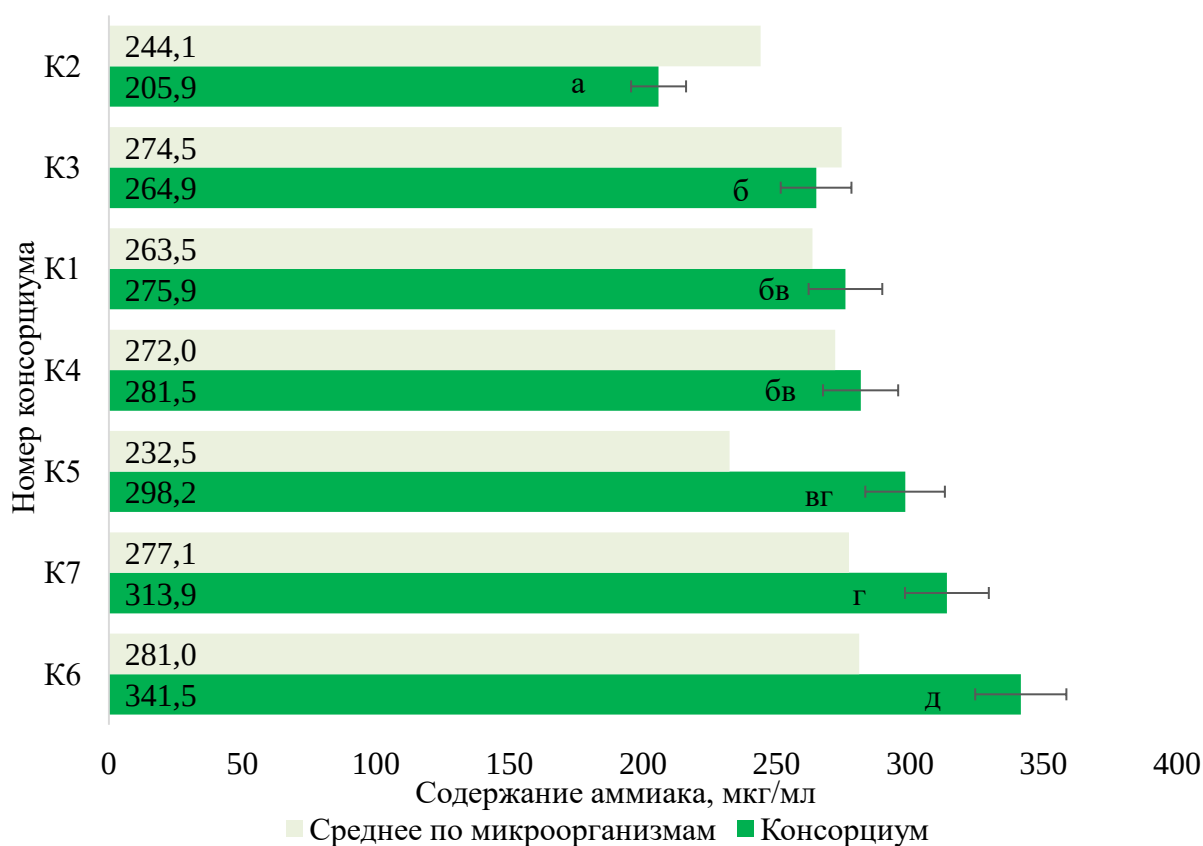
Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.1.1 – Способность консорциумов накапливать общий азот

Однофакторный дисперсионный анализ показал статистически значимое влияние состава микробных консорциумов на содержание азота в

культуральной среде. Максимальное содержание азота установлено для консорциума К3 – 209,79 мкг/см<sup>3</sup>. Следует отметить, что статистически значимых различий между К3 и вариантами К5, К6 и К7 не выявлено. Это свидетельствует о сопоставимом уровне активности данных консорциумов. Содержание азота в вариантах К5, К6 и К7 составило 195,58, 196,81 и 193,96 мкг/см<sup>3</sup> соответственно.

Результаты исследования способности консорциумов продуцировать аммиак представлены на рисунке 4.1.2.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

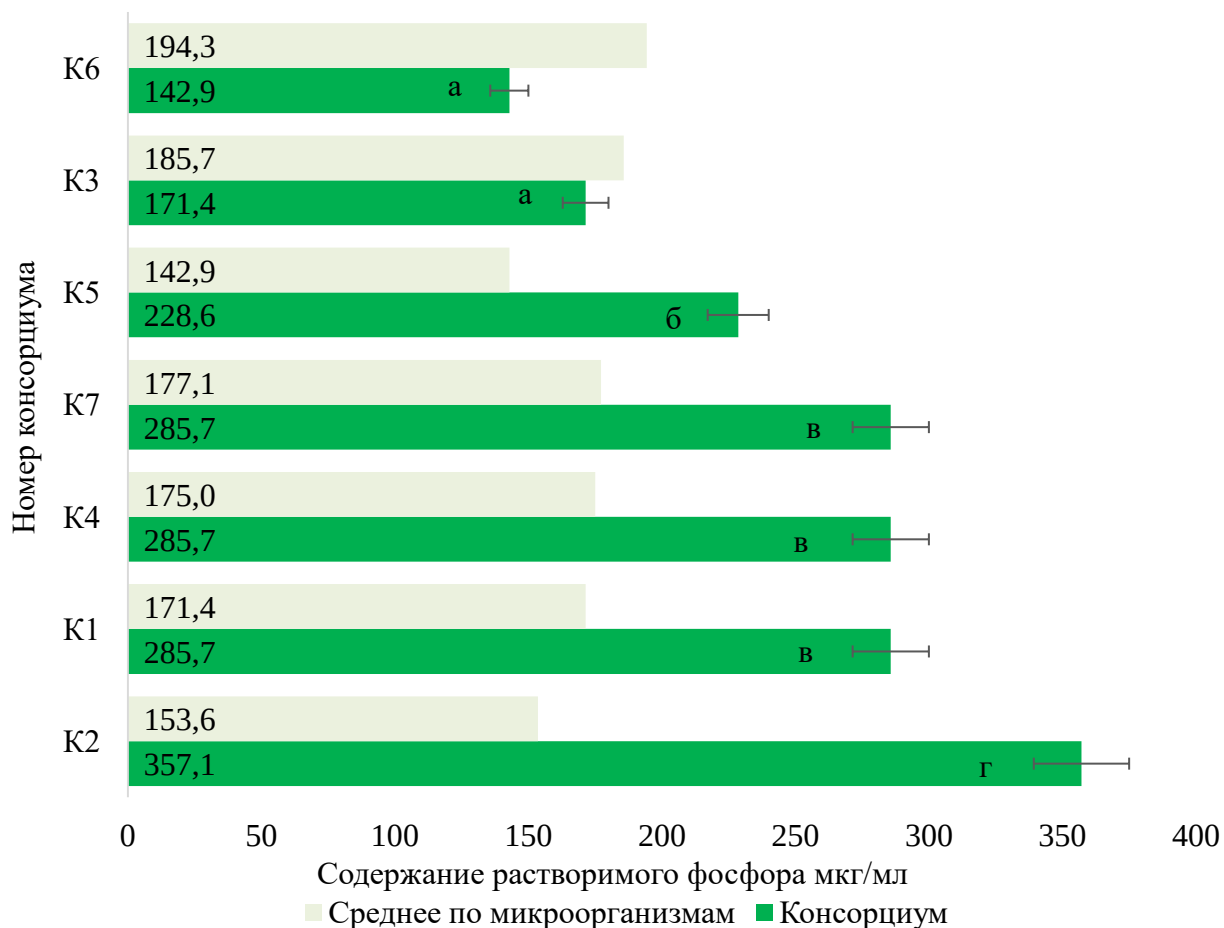
Рисунок 4.1.2 – Способность консорциумов продуцировать аммиак

Высокую способность продуцировать аммиак демонстрировали консорциумы К7 и К6. В варианте К7 содержание аммиака достигало 313,9 мкг/см<sup>3</sup> (среднее значение входящих в его состав микроорганизмов – 277,1 мкг/см<sup>3</sup>). Максимальное продуцирование аммиака установлено у

консорциума К6 – 341,5 мкг/см<sup>3</sup>, что на 60,5 мкг/см<sup>3</sup> превышало средний уровень продукции аммиака отдельными микроорганизмами (281,0 мкг/см<sup>3</sup>).

Совместное культивирование штаммов в составе консорциумов К2 и К3 приводит к снижению выхода аммиака по сравнению со средними показателями отдельных компонентов. В частности, в варианте К2 содержание аммиака в культуральной жидкости составило 205,9 мкг/см<sup>3</sup>, при этом средний показатель для штаммов, входящих в его состав – 244,1 мкг/см<sup>3</sup>. Аналогичную тенденцию наблюдали для консорциума К3.

Результаты исследования способности консорциумов солюбилизовать фосфаты представлены на рисунке 4.1.3.

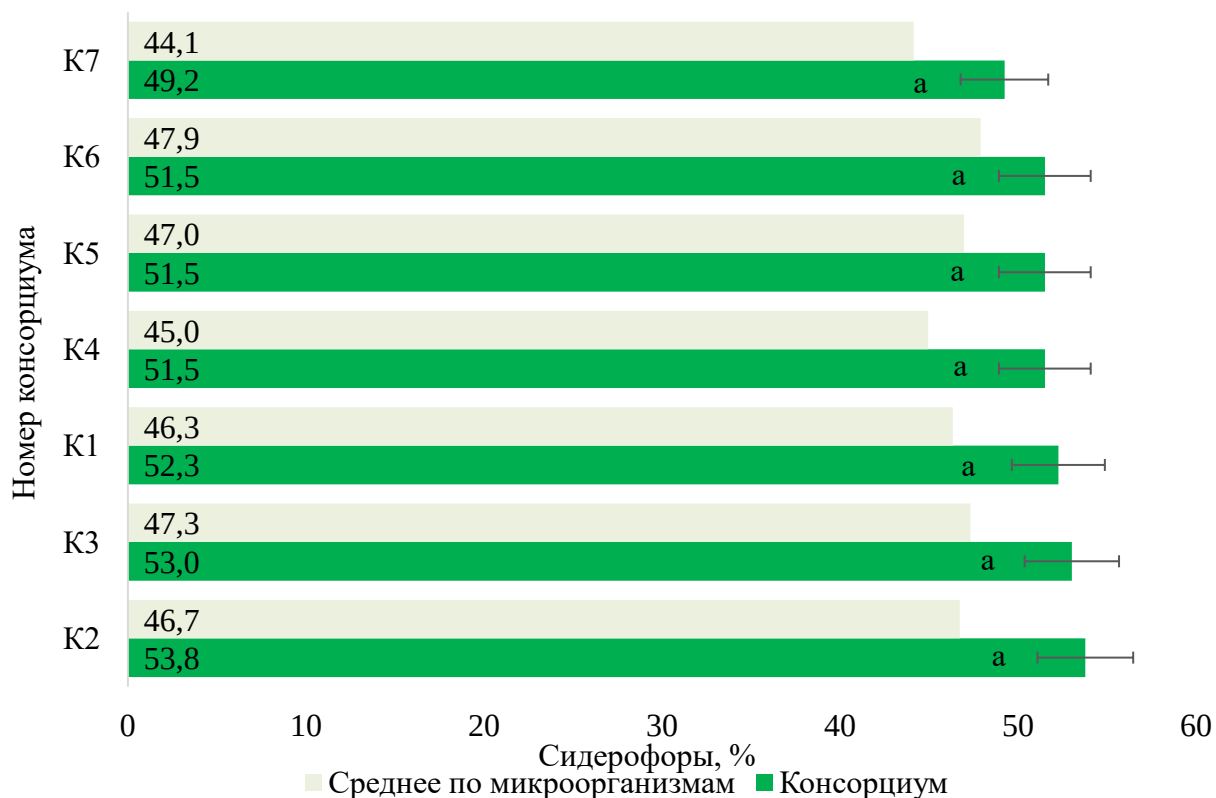


Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.1.3 – Способность консорциумов солюбилизовать фосфаты

Наиболее выраженная фосфатсольбилизирующая активность установлена для консорциума К2, в культуральной среде которого содержание растворимого фосфора достигало  $357,1 \text{ мкг/см}^3$ . Данное значение более чем в 2,3 раза превышало средний показатель микроорганизмов, входящих в состав консорциума ( $153,6 \text{ мкг/см}^3$ ), и соответствовало увеличению на 132,5 %. Для консорциума К5 исследуемый показатель достигал  $228,6 \text{ мкг/см}^3$ , что значительно превышало среднее значение отдельных микроорганизмов. В вариантах К7, К4 и К1 содержание растворимого фосфора было одинаковым и составляло  $285,7 \text{ мкг/см}^3$ . Для консорциумов К6 и К3 отмечено снижение исследуемого показателя относительно средних значений отдельных микроорганизмов.

Результаты исследования способности изучаемых консорциумов к производству сидерофоров представлены на рисунке 4.1.4.

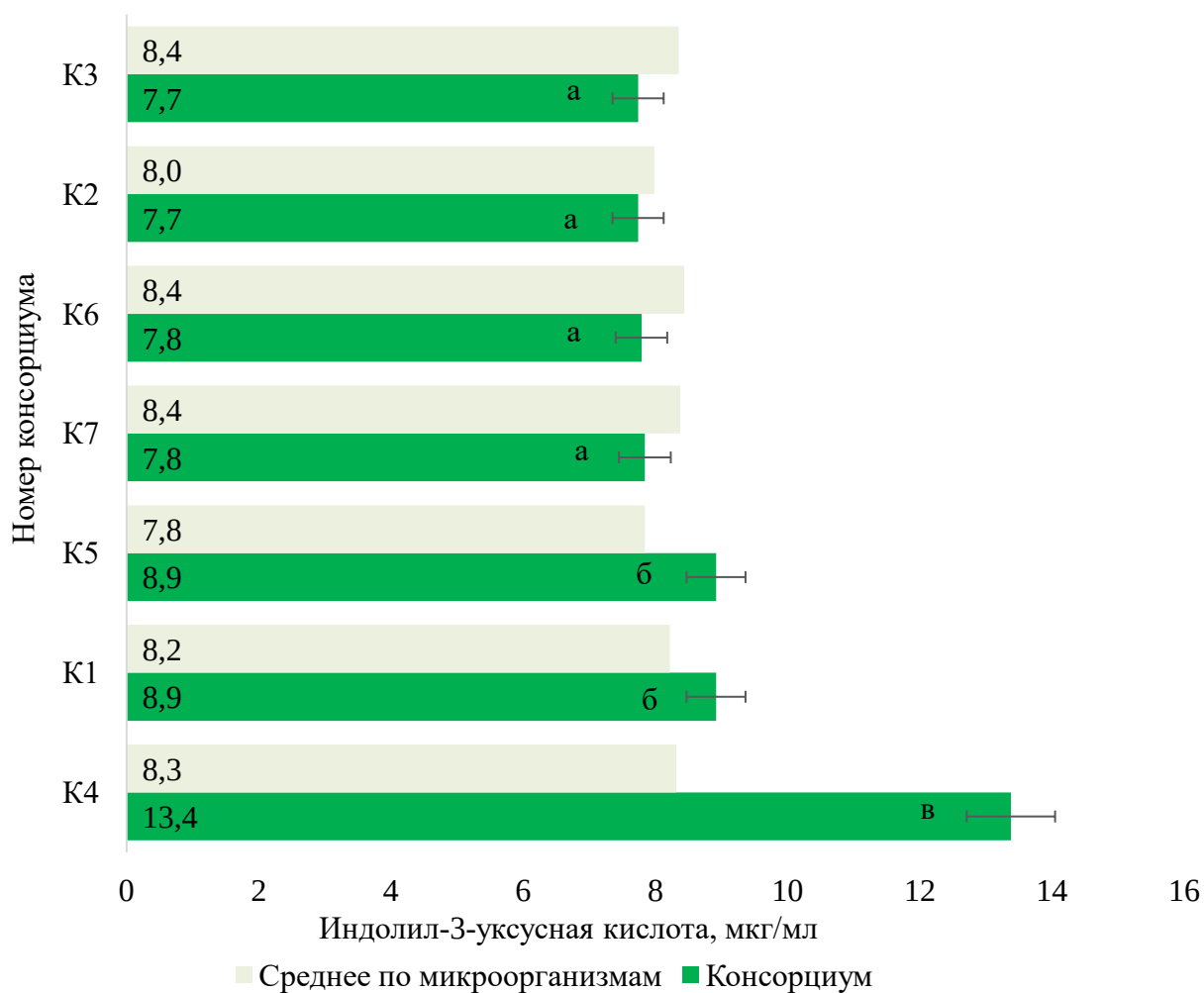


Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.1.4 – Способность консорциумов продуцировать сидерофоры

Согласно полученным данным исследуемые консорциумы характеризовались сопоставимой способностью к продуцированию сидерофоров. Статистически достоверные различия между всеми исследуемыми вариантами при  $p \leq 0,05$  отсутствовали.

Результаты исследования способности консорциумов к производству индолил-3-уксусной кислоты представлены на рисунке 4.1.5.



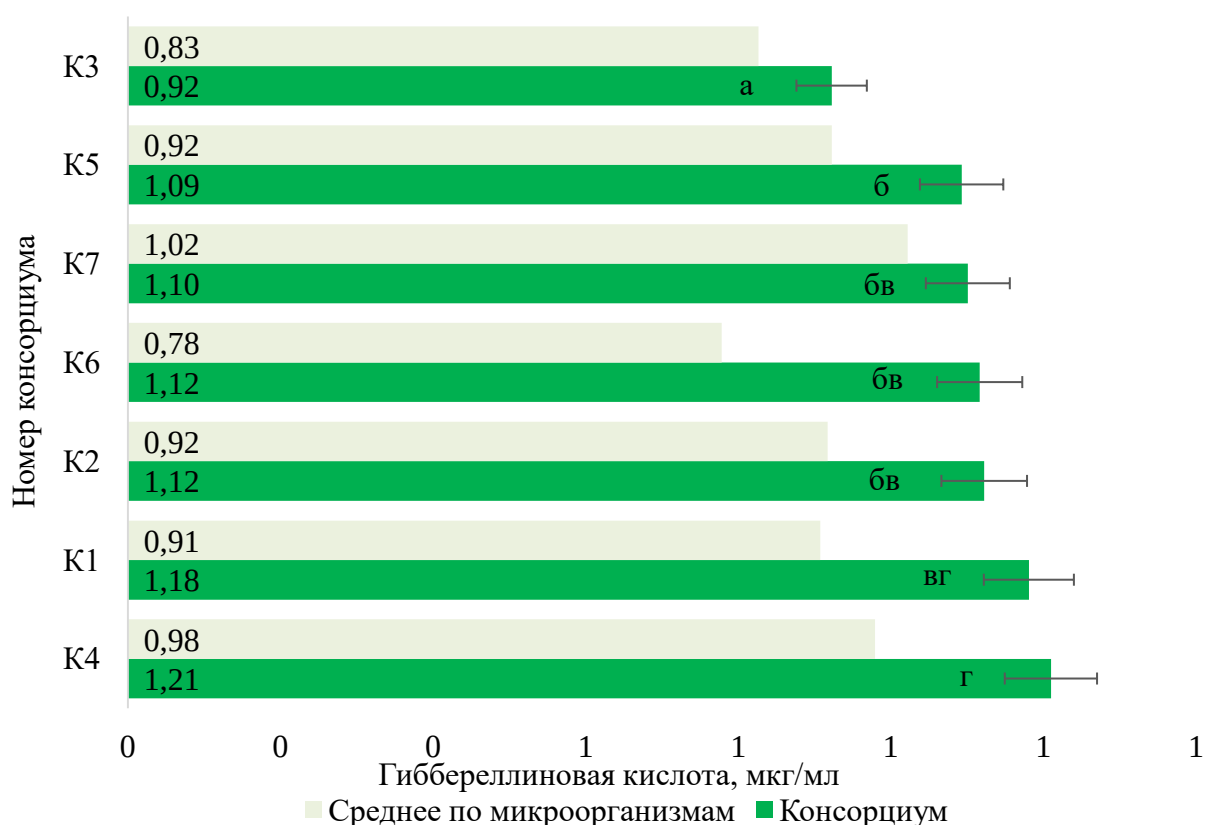
Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.1.5 – Способность консорциумов продуцировать индолил-3-уксусную кислоту

Наименьшее содержание индолил-3-уксусной кислоты отмечено для консорциумов K3 и K2 (7,7 мкг/см<sup>3</sup>), а также K6 и K7 (7,8 мкг/см<sup>3</sup>). По

результатам апостериорного анализа с использованием критерия Шеффе достоверных различий между указанными вариантами не установлено ( $p > 0,05$ ). Концентрация метаболита во всех четырех случаях оказалась ниже усредненных показателей исходных монокультур. Наибольшее содержание индолил-3-уксусной кислоты установлено для консорциума К4 – 13,4 мкг/см<sup>3</sup>. По критерию Шеффе данный показатель достоверно превышал значения всех остальных исследованных вариантов ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, содержание индолил-3-уксусной кислоты в варианте К4 существенно превышало среднее значение, установленное для микроорганизмов, входящих в состав данного консорциума (8,3 мкг/см<sup>3</sup>).

Результаты исследования способности консорциумов к производству гиббереллиновой кислоты представлены на рисунке 4.1.6.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.1.6 – Способность консорциумов продуцировать гиббереллиновую кислоту

Сопоставление активности консорциумов со средними значениями для входящих в их состав микроорганизмов показало увеличение содержания гиббереллиновой кислоты во всех исследованных вариантах. Наиболее выраженное превышение наблюдалось для К6, К1 и К4, что может свидетельствовать об усилении биосинтеза данного фитогормона при совместном культивировании штаммов. Анализ данных показал, что К3 обладал наименьшей способностью к синтезу гиббереллиновой кислоты ( $0,92 \text{ мкг/см}^3$ ). Наибольшее количество гиббереллиновой кислоты продуцировали консорциумы К1 и К4 ( $1,18$  и  $1,21 \text{ мкг/см}^3$ ), между которыми статистически достоверных различий не выявлено.

Результаты исследования антагонистической активности консорциумов в отношении фитопатогенов представлены в таблице 4.1.3.

Таблица 4.1.3 – Результаты антагонистической активности консорциумов в отношении фитопатогенов

| Консорциум | Антагонистическая активность, мм  |       |                                    |       |                                |       |                                  |       |                                      |       |
|------------|-----------------------------------|-------|------------------------------------|-------|--------------------------------|-------|----------------------------------|-------|--------------------------------------|-------|
|            | <i>Fusarium graminearum</i> F-877 |       | <i>Bipolaris sorokiniana</i> F-529 |       | <i>Botrytis cinerea</i> F-1006 |       | <i>Erwinia rhapontici</i> B-9292 |       | <i>Xanthomonas campestris</i> B-4102 |       |
|            | Знач.                             | Сред. | Знач.                              | Сред. | Знач.                          | Сред. | Знач.                            | Сред. | Знач.                                | Сред. |
| К1         | $95 \pm 3^a$                      | 78    | $95 \pm 5^a$                       | 84    | $95 \pm 3^a$                   | 40    | $95 \pm 5^a$                     | 23    | $95 \pm 4^a$                         | 89    |
| К2         | $95 \pm 3^a$                      | 76    | $95 \pm 3^a$                       | 87    | $53 \pm 2^b$                   | 40    | $30 \pm 2^b$                     | 28    | $73 \pm 3^b$                         | 91    |
| К3         | $95 \pm 4^a$                      | 82    | $50 \pm 2^b$                       | 86    | $71 \pm 3^b$                   | 36    | $81 \pm 3^b$                     | 17    | $86 \pm 4^{ab}$                      | 86    |
| К4         | $95 \pm 3^a$                      | 74    | $95 \pm 4^a$                       | 80    | $95 \pm 3^a$                   | 44    | $70 \pm 3^r$                     | 23    | $95 \pm 4^a$                         | 91    |
| К5         | $75 \pm 2^b$                      | 76    | $95 \pm 3^a$                       | 89    | $95 \pm 5^a$                   | 40    | $76 \pm 4^b$                     | 32    | $95 \pm 5^a$                         | 92    |
| К6         | $95 \pm 4^a$                      | 85    | $95 \pm 4^a$                       | 87    | $80 \pm 5^b$                   | 34    | $50 \pm 3^r$                     | 14    | $95 \pm 5^a$                         | 85    |
| К7         | $80 \pm 4^b$                      | 82    | $95 \pm 4^a$                       | 90    | $95 \pm 4^a$                   | 51    | $95 \pm 3^a$                     | 29    | $95 \pm 4^a$                         | 95    |

Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

В отношении *Fusarium graminearum* F-877 максимальная антагонистическая активность (зона ингибирования 95 мм) установлена для консорциумов К1, К2, К3, К4 и К6. По результатам апостериорного анализа с использованием критерия Шеффе достоверных различий между указанными вариантами не выявлено ( $p > 0,05$ ).

В отношении *Bipolaris sorokiniana* F-529 максимальную антагонистическую активность проявляли консорциумы K1, K2, K4, K5, K6 и K7 (зона ингибирования 95 мм) и статистически не различались между собой ( $p > 0,05$ ). Консорциум K3 проявлял значительно менее выраженную антагонистическую активность (зона ингибирования 50 мм). В отношении *Botrytis cinerea* F-1006 наиболее высокие значения антагонистической активности отмечены для консорциумов K1, K4, K5 и K7.

Наибольшие антагонистические свойства в отношении *Erwinia rhapontici* B-9292 проявляли консорциумы K1 и K7. В отношении *Xanthomonas campestris* B-4102 высокая антагонистическая активность характерна для консорциумов K1, K4, K5, K6 и K7.

Таким образом, на основании ростостимулирующей и антагонистической активностей для лабораторной апробации выбраны следующие консорциумы:

- K4 (состав: *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 1:1:3);
- K5 (состав: *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 2:1:1).

## 4.2 Лабораторная апробация микробных консорциумов

Для определения наиболее перспективного консорциума осуществили лабораторную апробацию (рисунок 4.2.1) консорциумов, а также штаммов, входящих в их состав.



сорт «Сибирский Альянс»



сорт «Памяти Афродиты»



сорт «Надежда Кузбасса»

Рисунок 4.2.1 – Лабораторная апробация перспективных консорциумов и входящих в их состав штаммов

Результаты исследования способности штаммов и консорциумов стимулировать рост и развитие яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс» в лабораторных условиях представлены в таблице 4.2.1.

Таблица 4.2.1 – Лабораторная апробация перспективных консорциумов и моноштаммов на яровой мягкой пшенице сорта «Сибирский Альянс»

| Образец  | Энергия прорастания, % | Всхожесть, %      | Средняя длина ростка, мм | Средняя длина корня, мм | Средняя сухая масса одного ростка, мг | Средняя сухая масса одного корня, мг |
|----------|------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Вар. 1.1 | 79±3 <sup>a</sup>      | 87±4 <sup>a</sup> | 124±5 <sup>a</sup>       | 94±3 <sup>a</sup>       | 27,3±1,0 <sup>a</sup>                 | 20,9±0,9 <sup>a</sup>                |
| Вар. 1.2 | 76±4 <sup>a</sup>      | 87±3 <sup>a</sup> | 125±6 <sup>a</sup>       | 97±3 <sup>a</sup>       | 30,3±1,3 <sup>ab</sup>                | 23,4±1,0 <sup>a</sup>                |
| Вар. 2.1 | 80±2 <sup>a</sup>      | 89±4 <sup>a</sup> | 158±7 <sup>b</sup>       | 138±5 <sup>b</sup>      | 34,5±1,5 <sup>ob</sup>                | 24,0±1,0 <sup>ab</sup>               |
| Вар. 2.2 | 83±4 <sup>a</sup>      | 92±4 <sup>a</sup> | 133±4 <sup>a</sup>       | 105±4 <sup>a</sup>      | 32,4±1,2 <sup>ab</sup>                | 27,6±1,2 <sup>ob</sup>               |
| Вар.2.3  | 81±3 <sup>a</sup>      | 82±4 <sup>a</sup> | 163±6 <sup>b</sup>       | 102±4 <sup>a</sup>      | 39,0±1,5 <sup>br</sup>                | 29,5±1,0 <sup>b</sup>                |
| Вар.3.1  | 87±4 <sup>a</sup>      | 88±3 <sup>a</sup> | 172±7 <sup>b</sup>       | 166±6 <sup>b</sup>      | 40,4±1,8 <sup>г</sup>                 | 36,8±1,7 <sup>г</sup>                |
| Вар. 3.2 | 87±4 <sup>a</sup>      | 91±3 <sup>a</sup> | 218±5 <sup>b</sup>       | 178±3 <sup>b</sup>      | 60,6±2,2 <sup>д</sup>                 | 44,4±1,6 <sup>д</sup>                |

Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Результаты исследований показали, что статистически достоверные различия в энергии прорастания и всхожести семян при различных вариантах обработки пшеницы сорта «Сибирский Альянс» отсутствуют. Наиболее выраженное положительное влияние бактериальных консорциумов установлено в отношении морфометрических показателей и накопления сухой биомассы проростков. Максимальные значения большинства исследуемых

параметров отмечены при использовании консорциума № 5 (вариант 3.2). Средняя длина ростка при данном варианте обработки достигала 218 мм и была достоверно выше значений других вариантов по критерию Шеффе ( $p \leq 0,05$ ).

По сравнению с контрольными вариантами 1.1 и 1.2 увеличение длины ростка составило соответственно 94 и 93 мм. Средняя длина корня достигала 178 мм, превышая контрольные значения на 84 и 81 мм. При этом статистически значимых различий с вариантом 3.1 не выявлено ( $p > 0,05$ ). Существенные различия установлены для накопления сухой биомассы пшеницы сорта «Сибирский Альянс». Средняя сухая масса одного ростка при применении консорциума № 5 составила 60,6 мг, что на 33,3 и 30,3 мг превышало значения вариантов 1.1 и 1.2. Средняя сухая масса одного корня достигала 44,4 мг и превышала соответствующие контрольные показатели на 23,5 и 21,0 мг. По данным показателям вариант 3.2 достоверно превышал остальные исследуемые варианты ( $p \leq 0,05$ ). Таким образом, результаты статистического анализа не подтверждают достоверного влияния консорциума № 5 на энергию прорастания и всхожесть семян яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс».

Результаты исследования способности штаммов и консорциумов стимулировать рост и развитие яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты» в лабораторных условиях представлены в таблице 4.2.2.

Таблица 4.2.2 – Лабораторная апробация перспективных консорциумов и моноштаммов на яровой мягкой пшенице сорта «Памяти Афродиты»

| Образец  | Энергия прорастания, % | Всхожесть, %      | Средняя длина ростка, мм | Средняя длина корня, мм | Средняя сухая масса одного ростка, мг | Средняя сухая масса одного корня, мг |
|----------|------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Вар. 1.1 | 72±3 <sup>a</sup>      | 76±3 <sup>a</sup> | 138±5 <sup>a</sup>       | 91±3 <sup>a</sup>       | 29,5±1,2 <sup>a</sup>                 | 22,8±1,1 <sup>ab</sup>               |
| Вар. 1.2 | 72±2 <sup>a</sup>      | 75±3 <sup>a</sup> | 142±6 <sup>ab</sup>      | 91±4 <sup>a</sup>       | 30,7±1,5 <sup>a</sup>                 | 21,7±1,0 <sup>a</sup>                |
| Вар. 2.1 | 76±2 <sup>a</sup>      | 78±2 <sup>a</sup> | 157±4 <sup>b</sup>       | 128±4 <sup>b</sup>      | 31,3±1,3 <sup>a</sup>                 | 26,0±1,2 <sup>b</sup>                |
| Вар. 2.2 | 75±3 <sup>a</sup>      | 77±3 <sup>a</sup> | 145±5 <sup>ab</sup>      | 95±2 <sup>a</sup>       | 33,1±1,2 <sup>a</sup>                 | 24,8±1,0 <sup>ab</sup>               |
| Вар. 2.3 | 81±4 <sup>a</sup>      | 81±4 <sup>a</sup> | 199±6 <sup>b</sup>       | 97±4 <sup>a</sup>       | 41,2±1,8 <sup>b</sup>                 | 24,1±1,3 <sup>ab</sup>               |
| Вар. 3.1 | 74±3 <sup>a</sup>      | 77±3 <sup>a</sup> | 146±3 <sup>ab</sup>      | 126±5 <sup>b</sup>      | 34,2±1,6 <sup>a</sup>                 | 30,2±1,2 <sup>b</sup>                |
| Вар. 3.2 | 79±4 <sup>a</sup>      | 81±3 <sup>a</sup> | 244±5 <sup>г</sup>       | 162±5 <sup>b</sup>      | 67,2±1,9 <sup>b</sup>                 | 45,0±1,0 <sup>г</sup>                |

Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Статистически значимых различий между вариантами по энергии прорастания и всхожести семян по критерию Шеффе не выявлено ( $p > 0,05$ ). Более выраженная дифференциация вариантов наблюдалась при оценке линейных параметров проростков и накопления сухой биомассы пшеницы сорта «Памяти Афродиты». Обработка семян штаммом *Ensifer meliloti* В-219 (вариант 2.1) способствовала увеличению средней длины ростка до  $157 \pm 4$  мм. Данный показатель достоверно превышал значение контроля при обработке семян дистиллированной водой –  $138 \pm 5$  мм (вариант 1.1). Вместе с тем статистически значимых различий между вариантом 2.1 и обработкой микробиологическим удобрением «Азофит» (вариант 1.2), штаммом *Ensifer mexicanus* В-4064 (вариант 2.2) и консорциумом № 4 (вариант 3.1) по данному показателю не установлено ( $p > 0,05$ ).

Наиболее выраженное действие штамма *E. meliloti* В-219 (вариант 2.1) отмечено на развитие корневой системы пшеницы сорта «Памяти Афродиты». Средняя длина корня составила  $128 \pm 4$  мм и была статистически достоверно выше значений, установленных в контроле (вариант 1.1), при использовании препарата «Азофит» (вариант 1.2), штамма *E. mexicanus* В-4064 (вариант 2.2) и штамма *Rhizobium tropici* В-216 (вариант 2.3). Статистически достоверных различий между вариантом 2.1 и обработкой консорциумом № 4 (вариант 3.1) не выявлено. Полученные результаты указывают на сопоставимое стимулирующее влияние *E. meliloti* В-219 и консорциума № 4 на линейный рост корневой системы проростков.

Применение штамма *E. mexicanus* В-4064 (вариант 2.2) не сопровождалось статистически значимым увеличением средней длины ростка и корня пшеницы сорта «Памяти Афродиты» относительно контрольных вариантов 1.1 и 1.2. Средняя длина ростка составляла  $145 \pm 5$  мм, а корня –  $95 \pm 2$  мм. По средней сухой массе одного ростка вариант 2.2 также статистически не отличался от контроля, препарата «Азофит», штамма *E. meliloti* В-219 и консорциума № 4. Следовательно, в условиях проведённого лабораторного опыта выраженного ростостимулирующего

эффекта *E. mexicanus* В-4064 по исследуемым морфометрическим показателям не установлено.

Среди моноштаммов наиболее выраженное стимулирующее действие на развитие надземной части проростков отмечено при обработке семян пшеницы сорта «Памяти Афродиты» штаммом *R. tropici* В-216 (вариант 2.3). Средняя длина ростка в данном варианте достигала  $199 \pm 6$  мм и достоверно превышала показатели контроля с дистиллированной водой (вариант 1.1), препарата «Азофит» (вариант 1.2), штаммов *E. meliloti* В-219 (вариант 2.1) и *E. mexicanus* В-4064 (вариант 2.2), а также консорциума № 4 (вариант 3.1). Аналогичная закономерность установлена для средней сухой массы одного ростка, которая в варианте 2.3 составила  $41,2 \pm 1,8$  мг и достоверно превышала значения вариантов 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 и 3.1.

Обработка семян пшеницы сорта «Памяти Афродиты» консорциумом № 4 (вариант 3.1) сопровождалась преимущественным стимулированием корневой системы растений. Средняя длина корня составила  $126 \pm 5$  мм и достоверно превышала значения, полученные в вариантах 1.1, 1.2, 2.2 и 2.3 ( $p \leq 0,05$ ), при отсутствии достоверных различий со штаммом *E. meliloti* В-219 (вариант 2.1). Средняя сухая масса одного корня при использовании консорциума № 4 достигала  $30,2 \pm 1,2$  мг и достоверно превышала значения вариантов 1.1–2.3. В то же время по средней длине и сухой массе одного ростка вариант 3.1 статистически не отличался от большинства вариантов с применением индивидуальных штаммов. Таким образом, действие консорциума № 4 было преимущественно связано с интенсификацией развития и накопления сухой биомассы корневой системы.

Максимальная ростостимулирующая активность установлена при обработке семян консорциумом № 5 (вариант 3.2). Средняя длина ростка и корня пшеницы сорта «Памяти Афродиты» составляли соответственно  $244 \pm 5$  и  $162 \pm 5$  мм, а средняя сухая масса одного ростка и одного корня –  $67,2 \pm 1,9$  и  $45,0 \pm 1,0$  мг. По всем четырём показателям вариант 3.2 достоверно превосходил контроль с дистиллированной водой (вариант 1.1), препарат

«Азофит» (вариант 1.2), индивидуальные штаммы *E. meliloti* В-219, *E. mexicanus* В-4064 и *R. tropici* В-216 (варианты 2.1, 2.2 и 2.3 соответственно), а также консорциум № 4 (вариант 3.1) по критерию Шеффе ( $p \leq 0,05$ ). При этом по энергии прорастания и всхожести статистически значимых различий варианта 3.2 с другими способами обработки не выявлено.

Результаты исследования способности штаммов и консорциумов стимулировать рост и развитие яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса» в лабораторных условиях представлены в таблице 4.2.3.

Таблица 4.2.3 – Лабораторная апробация перспективных консорциумов и моноштаммов на яровой мягкой пшенице сорта «Надежда Кузбасса»

| Образец  | Энергия прорастания, % | Всхожесть, %      | Средняя длина ростка, мм | Средняя длина корня, мм | Средняя сухая масса одного ростка, мг | Средняя сухая масса одного корня, мг |
|----------|------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Вар. 1.1 | 80±4 <sup>a</sup>      | 88±5 <sup>a</sup> | 129±5 <sup>a</sup>       | 91±3 <sup>a</sup>       | 27,3±1,2 <sup>a</sup>                 | 24,4±1,2 <sup>ab</sup>               |
| Вар. 1.2 | 81±3 <sup>a</sup>      | 89±4 <sup>a</sup> | 134±6 <sup>a</sup>       | 89±2 <sup>a</sup>       | 28,0±1,3 <sup>a</sup>                 | 22,2±1,1 <sup>a</sup>                |
| Вар. 2.1 | 82±2 <sup>a</sup>      | 90±5 <sup>a</sup> | 172±4 <sup>ob</sup>      | 130±4 <sup>o</sup>      | 28,6±1,2 <sup>a</sup>                 | 27,0±1,0 <sup>o</sup>                |
| Вар. 2.2 | 95±4 <sup>o</sup>      | 95±3 <sup>a</sup> | 156±7 <sup>or</sup>      | 93±4 <sup>a</sup>       | 32,0±1,0 <sup>a</sup>                 | 25,7±1,3 <sup>ab</sup>               |
| Вар. 2.3 | 89±3 <sup>ab</sup>     | 91±4 <sup>a</sup> | 191±9 <sup>b</sup>       | 97±5 <sup>a</sup>       | 38,9±1,6 <sup>b</sup>                 | 26,9±1,2 <sup>b</sup>                |
| Вар. 3.1 | 81±3 <sup>a</sup>      | 90±5 <sup>a</sup> | 146±5 <sup>ar</sup>      | 140±7 <sup>o</sup>      | 41,0±1,5 <sup>o</sup>                 | 47,0±1,8 <sup>b</sup>                |
| Вар. 3.2 | 86±4 <sup>ab</sup>     | 90±2 <sup>a</sup> | 214±6 <sup>l</sup>       | 178±6 <sup>b</sup>      | 53,4±1,8 <sup>b</sup>                 | 40,8±1,5 <sup>r</sup>                |

Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

По результатам однофакторного дисперсионного анализа достоверные различия по показателю всхожесть среди различных вариантов обработки отсутствовали. Максимальная энергия прорастания отмечена при обработке семян штаммом *Ensifer mexicanus* В-4064 (вариант 2.2) и составила 95±4 %. Данное значение достоверно превышало показатели контрольного варианта с обработкой дистиллированной водой (вариант 1.1), микробиологического удобрения «Азофит» (вариант 1.2), штамма *Ensifer meliloti* В-219 (вариант 2.1) и консорциума № 4 (вариант 3.1) по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$ . Вместе с тем статистически значимых различий между вариантом 2.2, штаммом *Rhizobium tropici* В-216 (вариант 2.3) и консорциумом № 5 (вариант 3.2) не установлено.

Несмотря на различия абсолютных значений всхожести, составлявших 88–95 %, статистическая значимость данного эффекта не подтверждена.

Обработка семян штаммом *E. meliloti* В-219 (вариант 2.1) оказывала положительное влияние преимущественно на линейные параметры проростков. Средняя длина ростка составила  $172 \pm 4$  мм и достоверно превышала показатели вариантов 1.1 и 1.2. Средняя длина корня достигала  $130 \pm 4$  мм и также была достоверно выше значений, установленных при обработке дистиллированной водой, препаратом «Азофит», штаммом *E. mexicanus* В-4064 и *R. tropici* В-216. При этом достоверных различий по длине корня между вариантом 2.1 и консорциумом № 4 (вариант 3.1) не выявлено. Таким образом, полученные результаты не позволяют характеризовать *E. meliloti* В-219 как неэффективный штамм, поскольку его применение сопровождалось статистически значимым увеличением линейного роста ростка и корня.

Штамм *R. tropici* В-216 (вариант 2.3) проявлял выраженное стимулирующее действие преимущественно в отношении надземной части проростков. Средняя длина ростка в данном варианте составляла  $191 \pm 9$  мм и достоверно превышала значения контрольных вариантов 1.1 и 1.2, а также вариантов с применением *E. mexicanus* В-4064 и консорциума № 4. Средняя сухая масса одного ростка достигала  $38,9 \pm 1,6$  мг и была достоверно выше показателей вариантов 1.1, 1.2, 2.1 и 2.2. В то же время по средней длине корня штамм *R. tropici* В-216 статистически не отличался от контрольных вариантов и *E. mexicanus* В-4064, что свидетельствует о преимущественной направленности его ростостимулирующего действия на развитие надземной части растения.

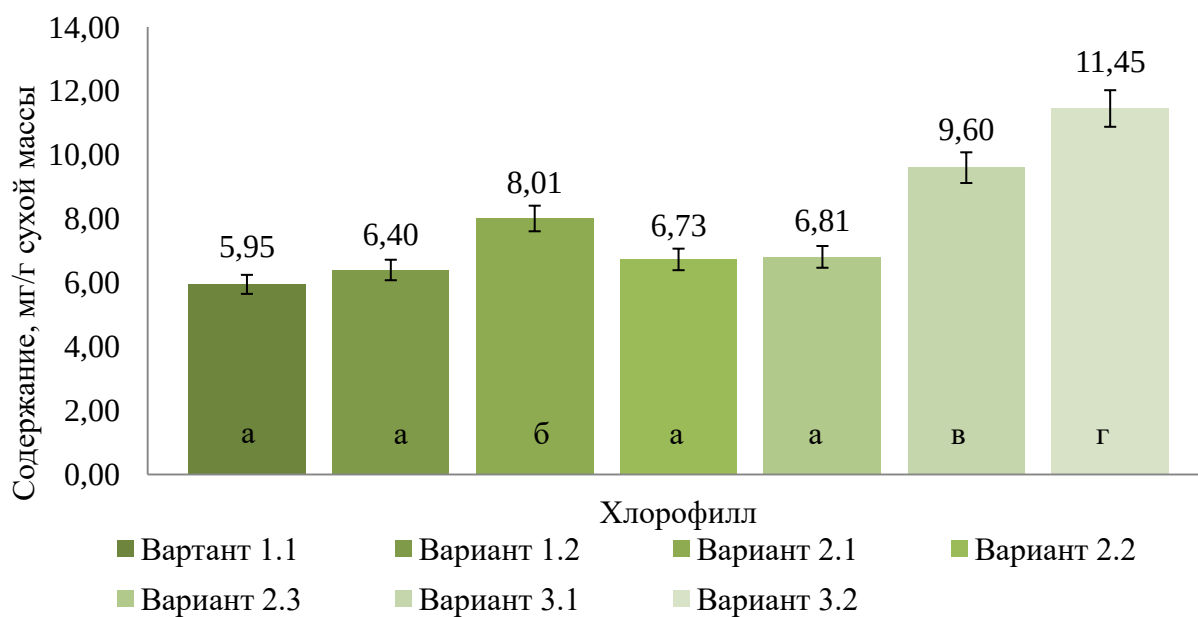
Применение консорциума № 4 (вариант 3.1) сопровождалось выраженной стимуляцией развития корневой системы. Средняя длина корня составила  $140 \pm 7$  мм и достоверно превышала показатели вариантов 1.1, 1.2, 2.2 и 2.3. Наибольшая средняя сухая масса одного корня среди исследуемых вариантов была установлена именно при обработке консорциумом № 4 и достигала  $47,0 \pm 1,8$  мг. Данный показатель достоверно превышал значения всех остальных вариантов, включая консорциум № 5 ( $p \leq 0,05$ ).

Обработка консорциумом № 4 обеспечивала статистически достоверное увеличение сухой массы ростка относительно контрольных вариантов и вариантов с применением штаммов *E. meliloti* В-219 и *E. mexicanus* В-4064.

Наиболее выраженный комплексный эффект на линейный рост растений установлен при использовании консорциума № 5 (вариант 3.2). Средняя длина ростка составила  $214 \pm 6$  мм, а средняя длина корня –  $178 \pm 6$  мм; по обоим показателям вариант 3.2 достоверно превосходил все остальные исследуемые варианты. Средняя сухая масса одного ростка достигала  $53,4 \pm 1,8$  мг и также была достоверно выше значений всех других вариантов. Средняя сухая масса одного корня составляла  $40,8 \pm 1,5$  мг и достоверно превышала показатели контрольных вариантов и вариантов с индивидуальными штаммами, однако была статистически значимо ниже значения, установленного для консорциума № 4.

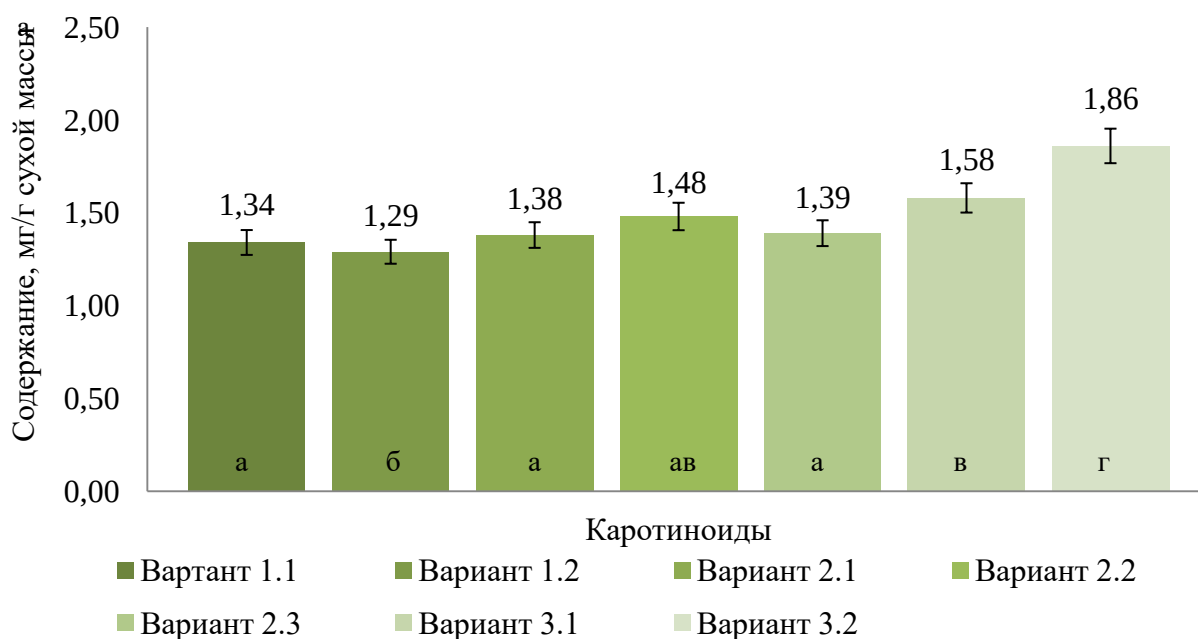
Данные результаты свидетельствуют о высокой эффективности консорциума № 5 и его потенциале для повышения роста и развития яровой мягкой пшеницы сортов «Сибирский Альянс», «Памяти Афродиты», «Надежда Кузбасса». Наряду с улучшением морфометрических показателей обработка растений бактериальными штаммами и консорциумами сопровождалась изменением содержания основных фотосинтетических пигментов – хлорофилла и каротиноидов.

Результаты исследований содержания хлорофилла а и b, а также каротиноидов в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс» представлены на рисунках 4.2.2–4.2.3. Согласно полученным данным вариант 3.2 (обработка консорциумом № 5) демонстрирует наиболее высокое содержание хлорофилла (11,45 мг/г сухой массы) и каротиноидов (1,86 мг/г сухой массы), что значительно превышает показатели контрольной группы (вариант 1.1 (обработка дистиллированной водой) – 5,95 и 1,34 мг/г сухой массы соответственно; вариант 1.2 (обработка «Азофитом») 6,40 и 1,29 мг/г сухой массы).



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

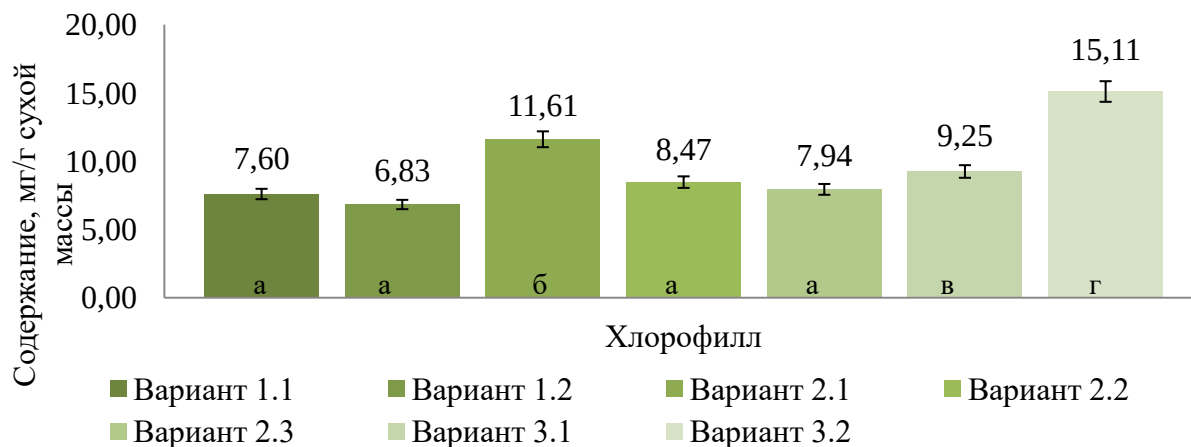
Рисунок 4.2.2 – Содержание хлорофилла а и б в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс»



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

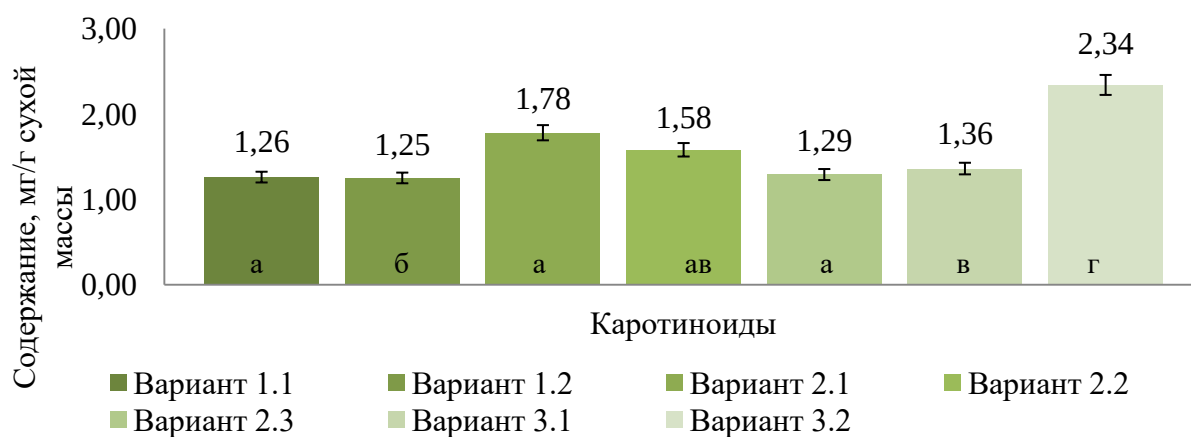
Рисунок 4.2.3 – Содержание каротиноидов в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс»

Результаты исследований содержания хлорофилла а и b, а также каротиноидов в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты» представлены на рисунках 4.2.4–4.2.5.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.2.4 – Содержание хлорофилла а и b в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты»



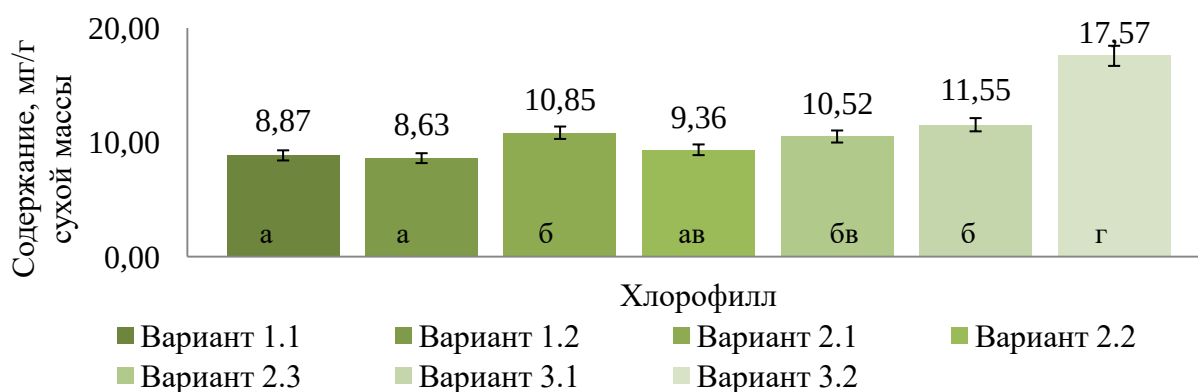
Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.2.5 – Содержание каротиноидов в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты»

Обработка консорциумом № 5 семян яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты» показала наибольший эффект по содержанию хлорофилла

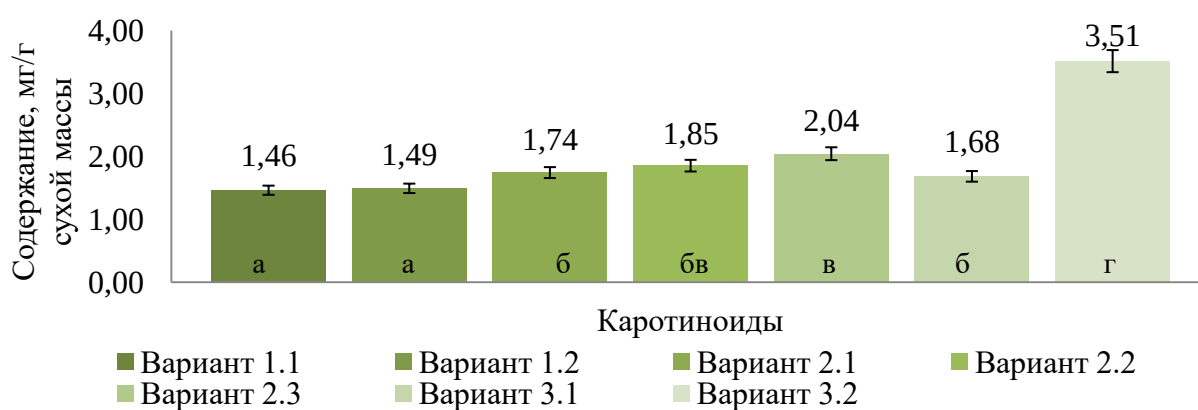
(15,11 мг/г сухой массы) и каротиноидов (2,34 мг/г сухой массы), по сравнению с контрольными вариантами (вариант 1.1 (обработка дистиллированной водой) – 7,60 и 1,26 мг/г сухой массы соответственно, вариант 1.2 (обработка «Азофитом») 6,83 и 1,25 мг/г сухой массы соответственно.

Результаты исследования содержания хлорофилла а и b, а также каротиноидов в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса» представлены на рисунках 4.2.6–4.2.7.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.2.6 – Содержание хлорофилла а и b в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса»



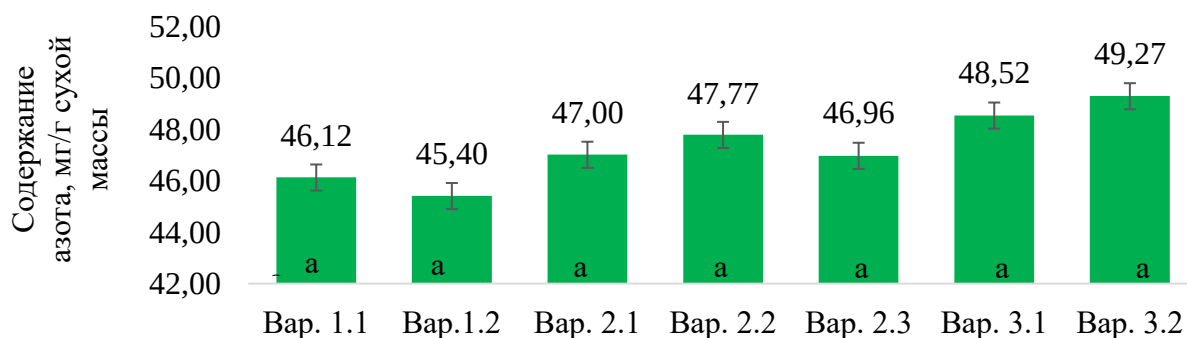
Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.2.7 – Содержание каротиноидов в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса»

Исследование показало, что обработка семян яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса» консорциумом № 5 привела к наибольшему повышению уровня хлорофилла и каротиноидов в растениях. В обработанных семенах содержание хлорофилла достигло 17,57 мг/г сухой массы, а каротиноидов – 3,51 мг/г сухой массы, что значительно выше, чем в контрольных вариантах (вариант 1.1 (обработка дистиллированной водой) – 8,87 и 1,46 мг/г сухой массы соответственно, вариант 1.2 (обработка «Азофитом») 8,63 и 1,19 мг/г сухой массы соответственно).

Полученные данные свидетельствуют о том, что обработка консорциумом № 5 сопровождалась повышением содержания фотосинтетических пигментов у исследованных сортов яровой мягкой пшеницы «Сибирский Альянс», «Памяти Афродиты», «Надежда Кузбасса». Данный эффект может носить опосредованный характер и быть связан с установленным положительным влиянием консорциума на рост и развитие растений.

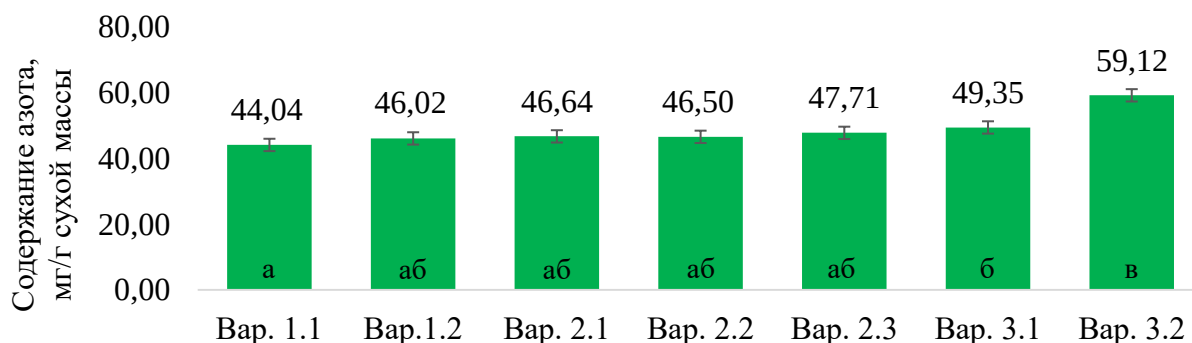
Исследование содержания азота в корнях и наземной части растений, обработанных штаммами и консорциумами, позволит оценить их эффективность в обеспечении растений данным элементом. Результаты анализа содержания азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс» представлены на рисунке 4.2.8.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.2.8 – Содержание азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс»

По результатам однофакторного дисперсионного анализа статистически значимых различий между исследуемыми вариантами по содержанию азота в надземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Сибирский Альянс» не выявлено. Результаты анализа содержания азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты» представлены на рисунке 4.2.9.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

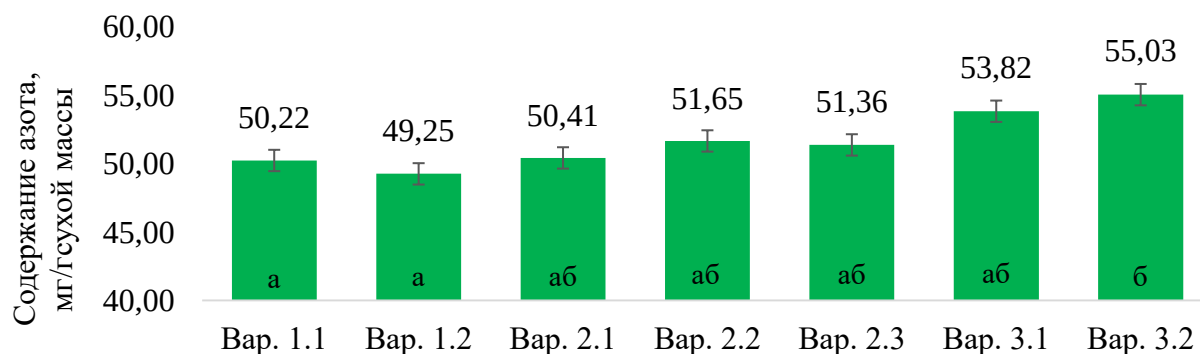
Рисунок 4.2.9 – Содержание азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты»

Наиболее выраженное влияние на накопление азота в надземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Памяти Афродиты» установлено для консорциума № 5 (вариант 3.2). Содержание азота в варианте составило  $59,12 \pm 1,89$  мг/г, что было статистически значимо выше значений всех остальных исследуемых вариантов по критерию Шеффе ( $p \leq 0,05$ ). По сравнению с контролем при обработке семян дистиллированной водой (вариант 1.1) содержание азота увеличилось на 15,08 мг/г, а относительно микробиологического удобрения «Азофит» (вариант 1.2) – на 13,10 мг/г.

По результатам апостериорного анализа с использованием критерия Шеффе содержание азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса» в варианте 3.2 достоверно выше показателей контрольного варианта с обработкой дистиллированной водой (вариант 1.1), а также с применением микробиологического удобрения «Азофит»

(вариант 1.2) при  $p \leq 0,05$ . Однако статистически значимых различий между консорциумом № 5 и вариантами обработки индивидуальными штаммами *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Rhizobium tropici* B-216, а также консорциумом № 4 не установлено.

Результаты анализа содержания азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса» представлены на рисунке 4.2.10.



Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Рисунок 4.2.10 – Содержание азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта «Надежда Кузбасса»

Содержание азота в наземной части растений варьировалось от 49,25 до 55,03 мг/г сухой массы. Максимальное значение установлено в варианте 3.2 — 55,03 мг/г, что превышало показатели вариантов 1.1 и 1.2 на 9,6 и 11,7 % соответственно; различия с данными контрольными вариантами были статистически значимыми ( $p \leq 0,05$ ). В варианте 3.1 содержание азота также было повышено и составило 53,82 мг/г, однако статистически значимых различий с остальными вариантами не установлено. В целом результаты свидетельствуют о тенденции к увеличению накопления азота при применении исследуемых консорциумов, наиболее выраженной в варианте 3.2.

Результаты лабораторной апробации свидетельствуют о выраженном, сортоспецифичном влиянии изученных бактериальных консорциумов на аккумуляцию азота в надземной биомассе яровой мягкой пшеницы. Во всех

исследованных образцах максимальные абсолютные значения данного показателя были зафиксированы при инокуляции консорциумом № 5.

У сорта «Памяти Афродиты» содержание азота в варианте 3.2 значительно превышало показатели других экспериментальных групп (по критерию Шеффе,  $p \leq 0,05$ ). В отношении сорта «Надежда Кузбасса» применение консорциума № 5 обеспечило статистически достоверное увеличение уровня азота относительно контрольных растений и варианта с использованием биоудобрения «Азофит», однако значимых различий с обработкой индивидуальными штаммами и консорциумом № 4 не выявлено. У сорта «Сибирский Альянс» при обработке консорциумом № 5 отмечено повышение содержания азота, однако статистическая значимость межвариантных различий не подтверждена ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, наиболее перспективным для создания биопрепарата является консорциум № 5 (состав: *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 2:1:1).

#### 4.3 Заключение по главе 4

Исследована биосовместимость перспективных ростостимулирующих бактерий (*Azospirillum brasilense* B-11094; *Azotobacter vinelandii* B-932, *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064, *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062, *Pantoea ananatis* B-5292, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548 и *Rhizobium tropici* B-216) при совместном культивировании, и сформировано 7 консорциумов на основе штаммов *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в разных соотношениях;

Исследована активность разработанных консорциумов *in vitro*, в частности, способность продуцировать вещества для стимулирования роста и развития зерновых культур, а именно пшеницы (индолил-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты, сидерофоры), солюбилизировать минеральные

соединения почв (фосфаты), фиксировать атмосферный азот, проявлять антагонистическую активность в отношении фитопатогенов пшеницы (*Fusarium graminearum* F-877, *Bipolaris sorokiniana* F-529, *Botrytis cinerea* F-1006, *Erwinia rhapontici* B-9292, *Xanthomonas campestris* B-4102); отобраны 2 перспективных консорциума для лабораторной апробации: консорциум № 4 (*Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 1:1:3 соответственно) и консорциум № 5 (*Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 2:1:1 соответственно).

Исследована эффективность влияния перспективных консорциумов на морфометрические показатели яровой мягкой пшеницы сортов «Сибирский Альянс», «Памяти Афродиты», «Надежда Кузбасса» в лабораторных условиях (энергия прорастания, всхожесть, средняя длина ростка, средняя длина корня, сухая масса наземной и подземной частей, содержание хлорофилла и каротиноидов в наземной части, а также содержание азота в наземной части); отобран 1 перспективный консорциум – № 5 (*Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 2:1:1 соответственно).

## ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ РИЗОБАКТЕРИЙ

Рассмотрены генетические и транскриптомные особенности перспективных штаммов, входящих в состав консорциума.

### 5.1 Сборка геномов

Биоинформатический анализ позволяет идентифицировать гены и функциональные кластеры генов, определяющие физиологические свойства микроорганизмов и биосинтез вторичных метаболитов. Для проведения анализа было проведено секвенирование генома [25].

Из штаммов с помощью набора ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit выделена ДНК. Спектрофотометрический анализ показал классический спектр поглощения ДНК, то есть качество и количество выделенной ДНК были достаточными для приготовления из неё библиотек (таблица 5.1.1).

Таблица 5.1.1 – Результаты флуориметрического анализа на Qubit концентраций выделенной бактериальной ДНК

| Образец                         | ДНК, нг/мкл | ДНК, мкг |
|---------------------------------|-------------|----------|
| <i>Ensifer meliloti</i> B-219   | 123         | 4,3      |
| <i>Ensifer mexicanus</i> B-4064 | 104         | 3,6      |
| <i>Rhizobium tropici</i> B-216  | 129         | 4,7      |

Для приготовления библиотек для MGIsseq ДНК предварительно фрагментировали ультразвуком на Covaris S2. Далее с помощью наборов NEBNext Ultra II DNA library prepkit готовили ДНК-библиотеки. Распределение длин находилось в диапазоне 200–700 п.н., что соответствует необходимым размерам при секвенировании на платформе MGIsseq-2000. Библиотеки

квантифицировали на Qubit, смешивали в эквимоллярном соотношении и секвенировали на секвенаторе MGISEQ-2000 с длиной прочтений  $2 \times 100$  нт.

В случае Polyseq фрагментация не проводилась и бралась исходная ДНК. Набором Barcode Library Preparation Kit проводилось лигирование адаптеров, содержащих уникальные баркоды для каждого образца. Далее полученные библиотеки эквимоллярно смешивались и проводился второй этап присоединения адаптеров с помощью Ligation Barcode Kit. Полученная суммарная ДНК-библиотека секвенировалась на платформе Polyseq One (таблица 5.1.2).

Таблица 5.1.2 – Результаты геномного секвенирования бактерий на платформах MGISEQ-2000 и Polyseq

| Образец                         | MGISEQ            |                   | Polyseq           |                   |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                 | Кол-во ридов, млн | Объем данных, Мб. | Кол-во ридов, млн | Объем данных, Мб. |
| <i>Ensifer meliloti</i> B-219   | 3,2               | 317               | 268,4             | 2742              |
| <i>Ensifer mexicanus</i> B-4064 | 2,8               | 277               | 291,4             | 2800              |
| <i>Rhizobium tropici</i> B-216  | 0,9               | 92                | 131,7             | 1329              |

Одним из самых важных параметров для нанопоровых прочтений является их длина. На рисунке 5.1.1 приведено распределение длин для прочтений в логарифмической шкале. Видно, что более трети ридов имеют длину более 10000 нт, чего, как правило, хватает для сборки кольцевой бактериальной хромосомы.

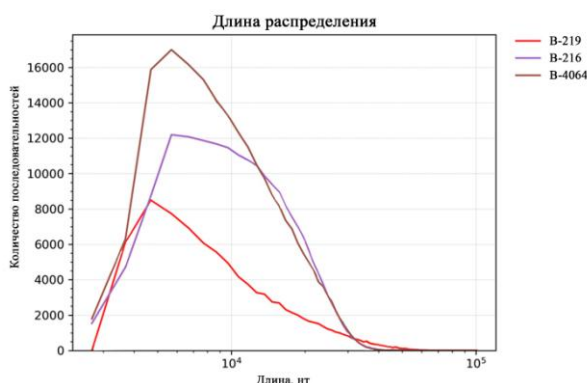


Рисунок 5.1.1 – Распределение длин нуклеотидных прочтений, полученных на платформе Polyseq one для трех бактериальных штаммов

Для всех исследуемых 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 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 удалением адаптерных последовательностей программой Cutadapt. Более 70 % используемых ридов имели качество  $Q>30$ . Целостность выделенной РНК оценивали по индексу RIN (таблица 5.1.3). Количество полученной тотальной РНК достаточно для проведения деплеции рРНК с помощью специализированного набора Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit.

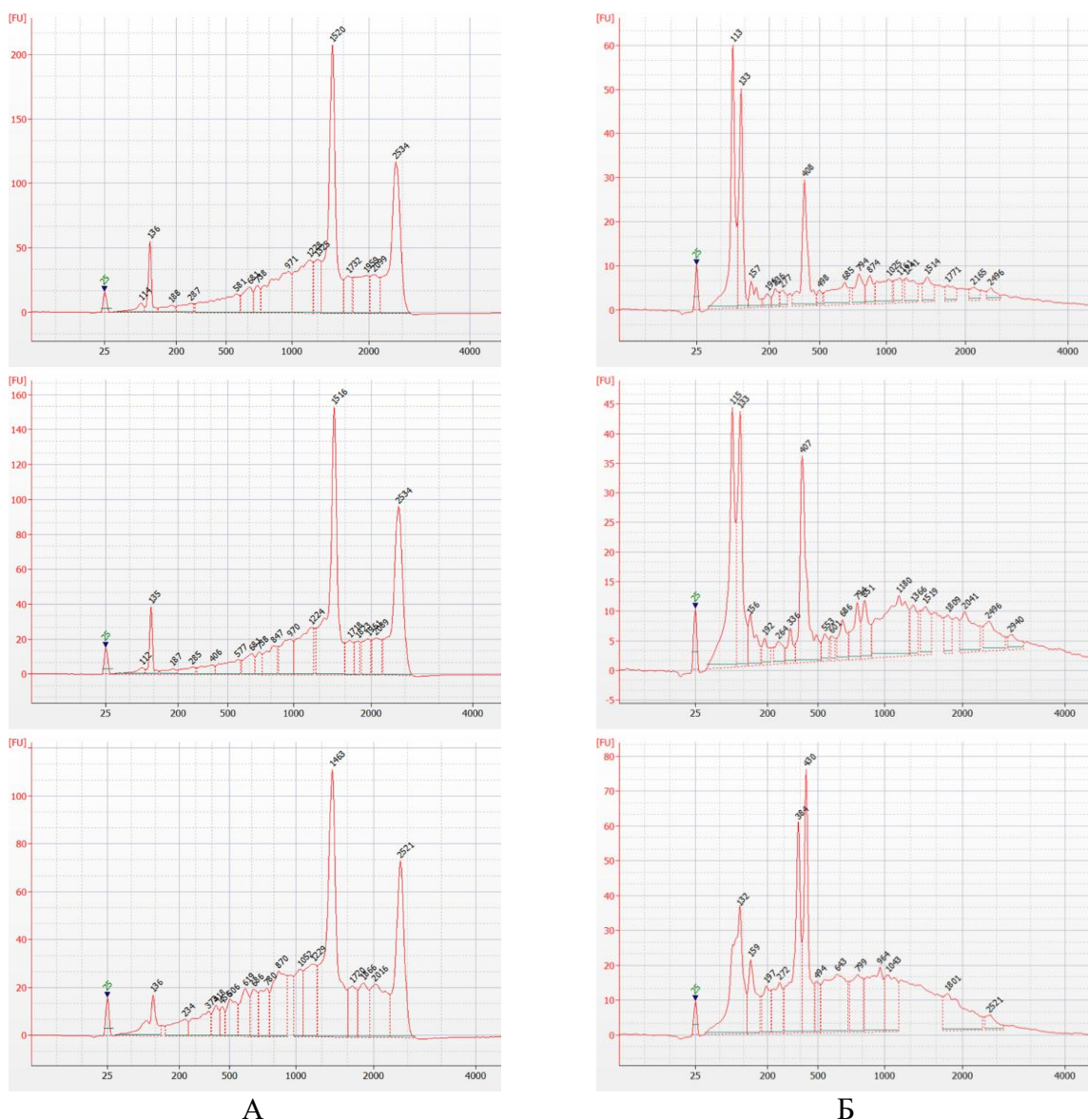
Из рисунка 5.1.2 видно, что в РНК после деплеции отсутствует рибосомальная РНК, которая превалировала в исходных образцах, что свидетельствует о качественном прохождении данного этапа. В результате секвенирования библиотек на геномном секвенаторе MGISEQ были получены парные прочтения длиной 100 нт объемом 38–44 млн парных ридов (таблица 5.1.4), чего достаточно для сборки кольцевой бактериальной хромосомы.

Таблица 5.1.3 – Результаты флуориметрического анализа на Qubit концентраций выделенной бактериальной РНК

| Образец                         | РНК, мкг | RIN |
|---------------------------------|----------|-----|
| <i>Ensifer meliloti</i> B-219   | 11,2     | 6,4 |
| <i>Ensifer mexicanus</i> B-4064 | 37,5     | 7,2 |
| <i>Rhizobium tropici</i> B-216  | 29       | 6,6 |

Таблица 5.1.4 – Результаты транскриптомного секвенирования бактерий на платформе MGISEQ-2000

| Образец                         | Кол-во ридов, млн | Объем данных, Гб |
|---------------------------------|-------------------|------------------|
| <i>Ensifer meliloti</i> B-219   | 40,2              | 4,02             |
| <i>Ensifer mexicanus</i> B-4064 | 38,0              | 3,80             |
| <i>Rhizobium tropici</i> B-216  | 43,8              | 4,38             |



Примечание: А – до деплеции рРНК; Б – после деплеции рРНК.

Рисунок 5.1.2 – Анализ распределения длин выделенной тотальной РНК

В результате исправления ошибок было отредактировано более 1000 ошибок, в том числе скорректировалась (увеличилась) длина геномов на 599–5102 нуклеотидов (таблица 5.1.5). Для точной таксономической идентификации геномы были проанализированы программой GTDB-tk, которая проводит построение филогеномных деревьев на основе выравнивания 120 консервативных бактериальных белков, полученных из более чем 80 тысяч геномов базы GTDB (таблица 5.1.5).

Таблица 5.1.5 – Результаты *de novo* сборки и аннотации геномов

| Образец                        | B-219                      | B-4064                   | B-216                           |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Геном до исправления ошибок    | 5 121 473                  | 4 419 397                | 7 107 326                       |
| Геном после исправления ошибок | 5 126 575                  | 4 423 271                | 7 107 925                       |
| GC состав, %                   | 38,3                       | 43,2                     | 62,9                            |
| CDS                            | 5178                       | 4511                     | 6289                            |
| Кластеров рРНК                 | 13                         | 10                       | 5                               |
| тРНК                           | 122                        | 86                       | 69                              |
| Покрытие                       | 596,7×                     | 695,6×                   | 199,9×                          |
| Ближайший гомолог по GTDB      | <i>Priestia aryabhatai</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> |

Наибольшее значение GC-состава (62,9 %) наблюдалось у изолята *Rhizobium tropici* B-216, идентифицированного как *Pseudomonas chlororaphis*, у *Priestia aryabhatai* (*Ensifer meliloti* B-219) – минимальные 38,3 %. Количество предсказанных кодирующих последовательностей (CDS) колебалось от 4511 до 6289, кластеров рРНК – от 5 до 13, а тРНК – от 69 до 122.

Исследуемые штаммы относились к *Priestia aryabhatai* (*Ensifer meliloti* B-219), *Bacillus subtilis* (*Ensifer mexicanus* B-4064) и *Pseudomonas chlororaphis* (*Rhizobium tropici* B-216). Филогеномные деревья представлены на рисунках 5.1.3–5.1.4.

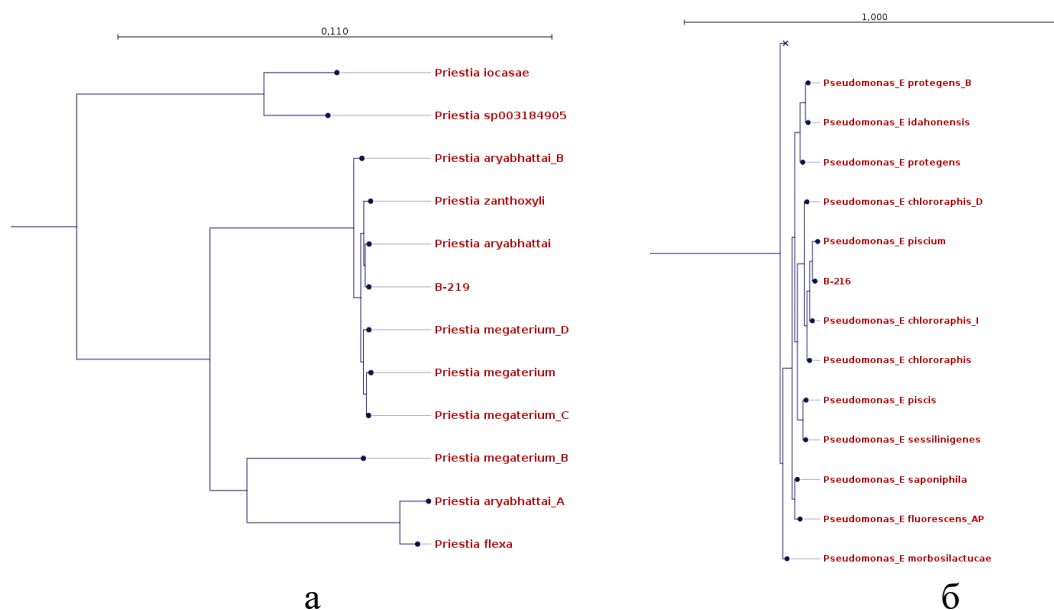


Рисунок 5.1.3 – Филогенетические деревья *Priestia aryabhatai* (а) и *Pseudomonas chlororaphis* (б)

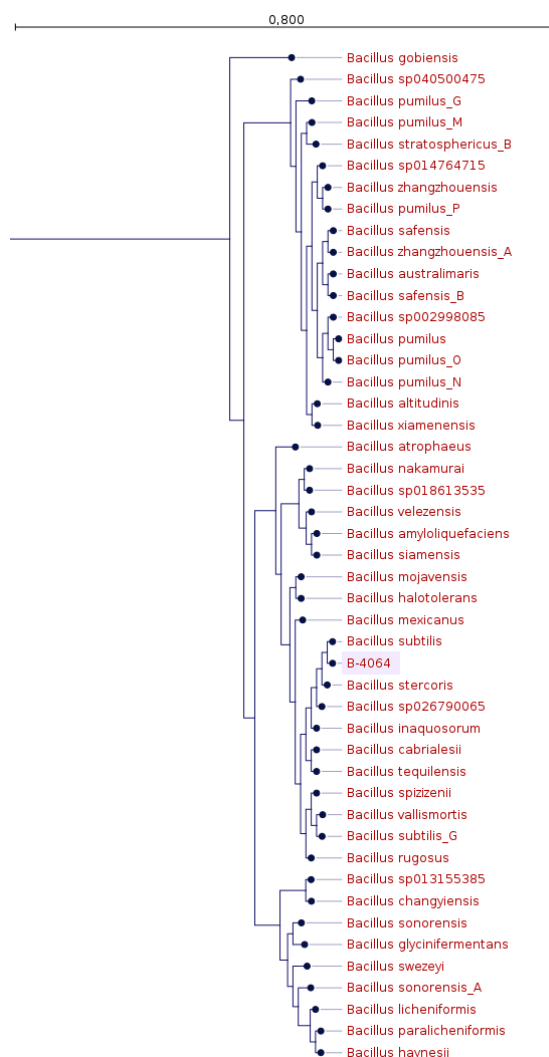


Рисунок 5.1.4 – Филогенетическое дерево *Bacillus subtilis*

*Priestia aryabhattai* является грамположительной аэробной спорообразующей бактерией, способной к азотфиксации, солюбилизации фосфатов, синтезу индолил-3-уксусной кислоты и антиоксидантных соединений. Основными местами её обитания являются почва и эндосфера растений. *Bacillus subtilis* представляет собой грамположительную факультативно-анаэробную спорообразующую бактерию, широко используемую в качестве модельного организма. К её основным функциональным особенностям относятся синтез антибиотических соединений и ферментов, а также способность к образованию биоплёнок. Бактерия распространена в почве, ассоциирована с растениями и обнаруживается в кишечнике животных. *Pseudomonas chlororaphis* является грамотрицательной

аэробной бактерией, способной синтезировать феназиновые соединения, подавлять возбудителей грибных заболеваний растений и стимулировать их рост. Она широко распространена в почве и ризосфере растений и представляет интерес как перспективный агент биологического контроля.

Качество сборки оценивали с помощью BUSCO по наличию однокопийных ортологов (рисунок 5.1.5).

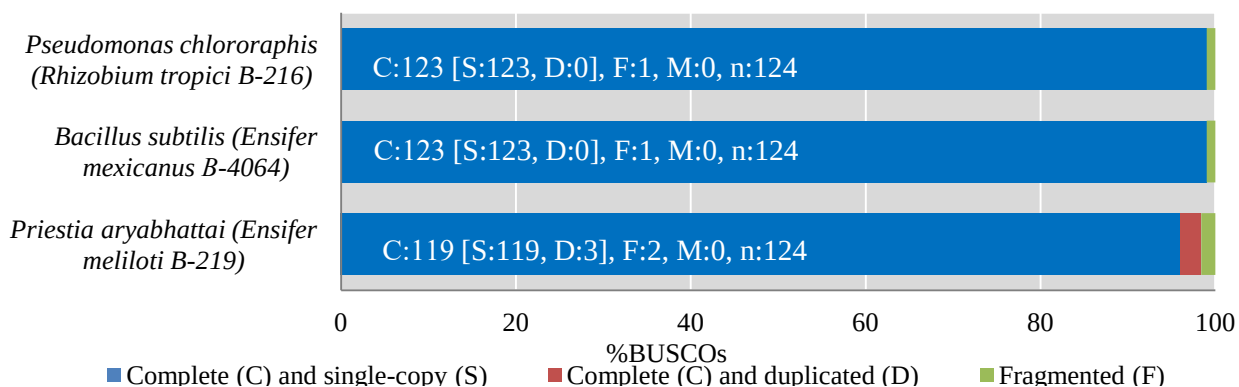


Рисунок 5.1.5 – Анализ генов однокопийных ортологов в сборках бактериальных геномов с помощью BUSCO

Из представленных данных видно, что для штамма *Priestia aryabhattai* найдено 119 генов, для штаммов *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* – 123 гена, что указывает на высокое качество полученных геномов.

## 5.2 Транскриптомные исследования

Транскриптомные прочтения, полученные при секвенировании на геномном секвенаторе MGISEQ-2000, вначале анализировались на предмет качества. Анализ показал, что было необходимо проведение тримирования адаптерных последовательностей и фильтрации по качеству. С помощью Cutadapt были проведены обозначенные манипуляции. Картирование отфильтрованных прочтений проводили с использованием CLC GW на

собранные *de novo* и аннотированные бактериальные геномы. Доля картировавшихся ридов была в среднем более 98 %, что можно считать хорошим результатом. Следует отметить, что содержание рибосомальной РНК в RNA-seq прочтениях составило около 2–3 % и такие небольшие цифры свидетельствуют о качественном прохождении этапа деплеции рРНК. Экспрессия генов оценивалась по параметру Transcripts Per Million (TPM), который является нормализованным показателем уровня экспрессии гена, отражающим количество транскриптов данного гена, приходящееся на миллион транскриптов в образце.

Таким образом, с помощью CLC GW были рассчитаны Transcripts Per Million для всех генов каждого бактериального штамма, геномы которых аннотированы ранее. Количество генов составляло порядка 4,5–6,0 тыс. Их необходимо категоризировать с учетом экспрессии генов, потенциально связанных с усилением роста и защиты растений (PGP). Для классификации таких генов было выбрано 7 общих категорий:

- 1) биосинтез фитогормонов и регуляторов роста;
- 2) стрессоустойчивость и защита растений;
- 3) энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере;
- 4) биосинтез аминокислот и кофакторов;
- 5) метаболизм липидов и мембран;
- 6) транспорт и усвоение питательных веществ;
- 7) биосинтез антимикробных соединений и вторичных метаболитов.

Для каждого штамма собраны данные по генам, потенциально связанным с усилением роста и защиты растений (таблицы 5.2.1–5.2.3). Для штамма *Priestia aryabhatai* выраженная активность наблюдается в категориях энергетического метаболизма и стрессоустойчивости. Потенциал для биосинтеза вторичных метаболитов подтверждается наличием генов синтеза изопреноидов и антибиотиков. Отсутствуют классические PGP-гены прямого действия (АЦК-деаминаза, сидерофоры). Преобладают косвенные PGP-механизмы через улучшение выживаемости бактерий в ризосфере. Данный штамм демонстрирует

хороший потенциал за счет механизмов косвенного действия, особенно в области стрессоустойчивости и энергетического метаболизма.

Штамм *Bacillus subtilis* обладает сильной системой стрессоустойчивости и высокой общей метаболической активностью. Вероятные PGP-механизмы включают индукцию систем стрессоустойчивости у растения, возможный синтез гиббереллинов, а также осмотическую защиту. Не обнаружены гены прямой фиксации азота или солюбилизации фосфата.

В штамме *Pseudomonas chlororaphis* к наиболее выраженным PGP-функциям можно отнести биосинтез аминокислот и кофакторов (самый высокий средний TPM), энергетический метаболизм и биосинтез фитогормонов. Можно отметить достаточно большое количество генов, относящихся к категориям «стрессоустойчивость» и «транспорт питательных веществ». Штамм демонстрирует сильный PGP потенциал с акцентом на синтез предшественников фитогормонов, обеспечение стрессоустойчивости и эффективный транспорт микроэлементов, что потенциально делает его перспективным для применения в сельском хозяйстве.

Так, циклические липопептиды сурфактин и фенгицин характеризуются широким спектром антибактериальной и противогрибковой активности, а также способностью индуцировать системную устойчивость растений, что снижает поражаемость фитопатогенами и способствует улучшению физиологического состояния растений [61]. Бациллаен рассматривается как антибиотик с выраженным ингибирующим действием в отношении ряда бактерий и грибов, участвующий в конкурентных взаимодействиях в ризосфере и эндосфере растений [79]. Сидерофор бациллибактин, помимо функции хелатирования железа, ограничивает доступ этого элемента для фитопатогенов, что усиливает антагонистический потенциал продуцирующих его микроорганизмов [55]. Пептидные антибиотики субтилизин А и бацилизин также проявляют выраженную антимикробную активность против широкого круга микроорганизмов, включая фитопатогенные бактерии и грибы [247].

Таблица 5.2.1 – Список генов, экспрессирующихся в штамме *Priestia aryabhattai* и потенциально связанных с усилением роста и защиты растений

| Название гена                                        | TPM    | Продукт гена                                             | PGPB-функция              | Обоснование                                                                                |
|------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста           |        |                                                          |                           |                                                                                            |
| <i>ispD</i>                                          | 458,7  | 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат цитидилилтрансфераза      | Биосинтез изопреноидов    | Участвует в MEP пути биосинтеза изопреноидов – предшественников фитогормонов               |
| <i>ispF</i>                                          | 51,8   | 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат синтаза          | Биосинтез изопреноидов    | Ключевой фермент пути биосинтеза изопреноидов, потенциальных предшественников фитогормонов |
| <i>dxr</i>                                           | 111,9  | 1-дезоксид-D-ксилулозо-5-фосфат редуктоизомераза         | Биосинтез изопреноидов    | Катализирует первую специализированную реакцию MEP пути биосинтеза изопреноидов            |
| Стрессоустойчивость и защита растений                |        |                                                          |                           |                                                                                            |
| <i>ctsR</i>                                          | 679,6  | Транскрипционный регулятор CtsR                          | Стрессоустойчивость       | Регулятор теплового шока и общего стрессового ответа                                       |
| <i>clpC</i>                                          | 2873,5 | АТФ-зависимая протеаза АТФ-связывающая субъединица ClpC  | Стрессоустойчивость       | Обеспечивает оборот белков при стрессе, удаление денатурированных белков                   |
| <i>radA</i>                                          | 118,9  | Белок репарации ДНК RadA                                 | Стрессоустойчивость       | Участвует в репарации ДНК при окислительном и другом стрессе                               |
| <i>disA</i>                                          | 143,1  | Диаденилатциклаза циклаза DisA                           | Стрессоустойчивость       | Сканирует целостность ДНК, активирует стрессовый ответ при повреждениях                    |
| <i>hslV</i>                                          | 156,2  | АТФ-зависимая протеаза протеолитическая субъединица HslV | Стрессоустойчивость       | Протеолиз поврежденных стрессом белков                                                     |
| <i>hslU</i>                                          | 382,1  | АТФ-зависимая протеаза АТФ-азная субъединица HslU        | Стрессоустойчивость       | Регулирует протеолитическую активность при стрессе                                         |
| Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере |        |                                                          |                           |                                                                                            |
| <i>sucC</i>                                          | 1552,1 | ADP-формирующая сукцинат-КоА лигаза субъединица бета     | Энергетический метаболизм | Ключевой фермент цикла Кребса, обеспечивает энергетический метаболизм в ризосфере          |
| <i>sucD</i>                                          | 2161,4 | Сукцинат-КоА лигаза субъединица альфа                    | Энергетический метаболизм | Катализирует образование сукцинил-КоА в цикле Кребса                                       |

Продолжение таблицы 5.2.1

| Название гена                            | TPM    | Продукт гена                                                      | PGPB-функция                | Обоснование                                                                   |
|------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>acpP</i>                              | 1586,9 | Ацил-носитель белок                                               | Энергетический метаболизм   | Участвует в синтезе жирных кислот для мембран и энергетического метаболизма   |
| <i>FBFACN_00112</i>                      | 49,3   | 3-гидроксibuтирил-КоА дегидрогеназа                               | Накопление запасных веществ | Участвует в метаболизме полигидроксibuтирата – запасного вещества при стрессе |
| Биосинтез аминокислот и кофакторов       |        |                                                                   |                             |                                                                               |
| <i>cysE</i>                              | 145,4  | Серин-О-ацетилтрансфераза                                         | Биосинтез аминокислот       | Катализирует первую реакцию биосинтеза цистеина                               |
| <i>cysS</i>                              | 162,4  | Цистеин-тРНК лигаза                                               | Биосинтез аминокислот       | Активация цистеина для включения в белки                                      |
| <i>gltX</i>                              | 768,4  | Глутамат-тРНК лигаза                                              | Биосинтез аминокислот       | Активация глутамата для белкового синтеза                                     |
| <i>proS</i>                              | 83,7   | Пролин-тРНК лигаза                                                | Биосинтез аминокислот       | Активация пролина                                                             |
| Метаболизм липидов и мембран             |        |                                                                   |                             |                                                                               |
| <i>fabD</i>                              | 145,8  | ACP S-малонилтрансфераза                                          | Синтез липидов              | Катализирует перенос малонильной группы на ACP в синтезе жирных кислот        |
| <i>fabG</i>                              | 388,4  | 3-оксоацил-[ацил-белок-носитель] редуктаза                        | Синтез липидов              | Восстановление 3-оксоацил-ACP в синтезе жирных кислот                         |
| <i>fapR</i>                              | 73,7   | Транскрипционный фактор FapR                                      | Регуляция синтеза липидов   | Регулятор синтеза жирных кислот                                               |
| <i>plsX</i>                              | 91,3   | Фосфат ацилтрансфераза PlsX                                       | Синтез липидов              | Синтез фосфолипидов мембран                                                   |
| <i>cdsA</i>                              | 43,7   | Фосфатидат цитидилилтрансфераза                                   | Синтез липидов              | Синтез фосфолипидов мембран                                                   |
| Транспорт и усвоение питательных веществ |        |                                                                   |                             |                                                                               |
| <i>ecfA1</i>                             | 219,2  | Фактор энергетической связи ABC транспортер АТР-связывающий белок | Транспорт витаминов         | Участвует в транспорте витаминов и кофакторов                                 |
| <i>ecfA2</i>                             | 83,3   | Фактор энергетической связи ABC транспортер АТР-связывающий белок | Транспорт витаминов         | АТР-связывающий компонент системы транспорта витаминов                        |
| <i>ecfT</i>                              | 44,1   | Трансмембранный белок EcfT энергетической связи транспортера      | Транспорт витаминов         | Трансмембранный компонент системы транспорта витаминов                        |
| <i>FBFACN_00068</i>                      | 3,9    | Белок с MFS профилем                                              | Транспорт метаболитов       | Потенциальный транспортер различных субстратов                                |

Продолжение таблицы 5.2.1

| Название гена                                              | TPM  | Продукт гена                                      | PGPB-функция                     | Обоснование                                                                   |
|------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Биосинтез антимикробных соединений и вторичных метаболитов |      |                                                   |                                  |                                                                               |
| <i>FBFACN_00069</i>                                        | 11,4 | Пептидная синтетаза                               | Биосинтез антимикробных пептидов | Потенциально участвует в синтезе антимикробных нерибосомных пептидов          |
| <i>dltA/solG</i>                                           | 17,5 | D-аланин-поли(фосфоритол) лигаза                  | Модификация клеточной стенки     | Модификация тейхоевых кислот, повышение устойчивости к антимикробным пептидам |
| <i>solG</i>                                                | 22,3 | Соланимицин нерибосомная пептидная синтетаза SolG | Синтез антибиотиков              | Участвует в биосинтезе антибиотика соланимицина                               |

Таблица 5.2.2 – Список генов, экспрессирующихся в штамме *Bacillus subtilis* и потенциально связанных с усилением роста и защиты растений

| Название гена                              | TPM    | Продукт гена                                            | PGPB-функция                               | Обоснование                                                                              |
|--------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста |        |                                                         |                                            |                                                                                          |
| <i>ispD</i>                                | 420,5  | 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфат цитидилилтрансфераза     | Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста | МЕР путь биосинтеза изопреноидов - предшественников гиббереллинов                        |
| <i>ispF</i>                                | 71,0   | 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат синтаза         | Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста | МЕР путь биосинтеза изопреноидов - предшественников гиббереллинов                        |
| <i>dxr</i>                                 | 157,7  | 1-дезоксид-D-ксилоулозо-5-фосфат редуктоизомераза       | Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста | МЕР путь биосинтеза изопреноидов - предшественников гиббереллинов                        |
| <i>cysE</i>                                | 120,3  | Серин-О-ацетилтрансфераза                               | Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста | Синтез цистеина - предшественника для метаболитов, потенциально вовлеченных в синтез ИУК |
| <i>cysS</i>                                | 143,7  | Цистеин-тРНК лигаза                                     | Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста | Синтез цистеина - предшественника для метаболитов, потенциально вовлеченных в синтез ИУК |
| Стрессоустойчивость и защита растений      |        |                                                         |                                            |                                                                                          |
| <i>clpC</i>                                | 1033,2 | АТР-зависимая протеаза АТР-связывающая субъединица ClpC | Стрессоустойчивость и защита растений      | Ключевой белок теплового шока, деградация денатурированных белков при стрессе            |

## Продолжение таблицы 5.2.2

| Название гена                                        | TPM     | Продукт гена                                         | PGPB-функция                                         | Обоснование                                                                          |
|------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>ctsR</i>                                          | 247,9   | Транскрипционный регулятор CtsR                      | Стрессоустойчивость и защита растений                | Регулятор кассеты теплового шока, контролирует экспрессию генов стрессового ответа   |
| <i>mcsA</i>                                          | 405,5   | UVR домен-содержащий белок                           | Стрессоустойчивость и защита растений                | Компонент системы контроля качества белков при стрессе                               |
| <i>mcsB</i>                                          | 385,0   | Протеин-аргинин киназа                               | Стрессоустойчивость и защита растений                | Участвует в стрессовом ответе, регуляции белкового гомеостаза                        |
| <i>radA</i>                                          | 60,2    | Белок репарации ДНК RadA                             | Стрессоустойчивость и защита растений                | Репарация ДНК при окислительном и другом стрессе                                     |
| <i>disA</i>                                          | 88,2    | Диаденцилатциклаза сканирования целостности ДНК DisA | Стрессоустойчивость и защита растений                | Мониторинг целостности ДНК, ответ на стресс                                          |
| <i>rpoE</i>                                          | 75,6    | Фактор сигма-70 РНК-полимеразы                       | Стрессоустойчивость и защита растений                | Альтернативный сигма-фактор, ответственный за стрессовый ответ                       |
| <i>rseP</i>                                          | 161,3   | RIP металлопротеаза RseP                             | Стрессоустойчивость и защита растений                | Регуляция сигма-факторов, вовлеченных в стрессовый ответ                             |
| Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере |         |                                                      |                                                      |                                                                                      |
| <i>tuf</i>                                           | 24145,4 | Фактор элонгации Tu                                  | Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере | Высокая экспрессия указывает на активный белковый синтез и метаболическую активность |
| <i>fusA</i>                                          | 6591,6  | Фактор элонгации G                                   | Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере | Активный белковый синтез, поддержание клеточного метаболизма                         |
| <i>adk</i>                                           | 2760,7  | Аденилаткиназа                                       | Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере | Поддержание энергетического баланса клетки                                           |
| <i>pyrH</i>                                          | 797,9   | UMP киназа                                           | Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере | Участвует в биосинтезе пиримидинов, важных для нуклеиновых кислот                    |
| <i>frr</i>                                           | 1083,6  | Фактор рециклизации рибосом                          | Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере | Эффективный оборот рибосом, поддержание синтеза белка                                |
| Биосинтез аминокислот и кофакторов                   |         |                                                      |                                                      |                                                                                      |
| <i>gltX</i>                                          | 466,1   | Глутамат-тРНК лигаза                                 | Биосинтез аминокислот и кофакторов                   | Синтез глутамата - предшественника пролина (осмопротектор)                           |

## Продолжение таблицы 5.2.2

| Название гена                            | TPM    | Продукт гена                                     | PGPB-функция                             | Обоснование                                                                      |
|------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>proS</i>                              | 115,8  | Пролин-тРНК лигаза                               | Биосинтез аминокислот и кофакторов       | Синтез пролина – ключевого осмопротектора                                        |
| <i>ribF</i>                              | 294,6  | Бифункциональная рибофлавин киназа/FAD синтетаза | Биосинтез аминокислот и кофакторов       | Синтез кофакторов FAD и FMN, важных для энергетического метаболизма              |
| Метаболизм липидов и мембран             |        |                                                  |                                          |                                                                                  |
| <i>acpP</i>                              | 3010,5 | Ацил-переносающий белок                          | Метаболизм липидов и мембран             | Важен для биосинтеза жирных кислот – предшественников компонентов мембран        |
| <i>fabD</i>                              | 225,0  | ACP S-малонилтрансфераза                         | Метаболизм липидов и мембран             | Биосинтез жирных кислот                                                          |
| <i>fabG</i>                              | 393,7  | 3-оксоацил-[ацил-переносающий белок] редуктаза   | Метаболизм липидов и мембран             | Биосинтез жирных кислот                                                          |
| <i>cdsA</i>                              | 124,7  | Фосфатидат цитидилилтрансфераза                  | Метаболизм липидов и мембран             | Биосинтез фосфолипидов мембран                                                   |
| <i>uppS</i>                              | 174,7  | Изопренилтрансфераза                             | Метаболизм липидов и мембран             | Синтез ундекапренилфосфата – липидного переносчика в биосинтезе клеточной стенки |
| Транспорт и усвоение питательных веществ |        |                                                  |                                          |                                                                                  |
| <i>secY</i>                              | 3067,3 | Субъединица SecY препротейновой транслоказы      | Транспорт и усвоение питательных веществ | Секреция белков, потенциально вовлеченных в взаимодействие с растением           |
| <i>secE</i>                              | 48,9   | Субъединица SecE препротейновой транслоказы      | Транспорт и усвоение питательных веществ | Секреция белков                                                                  |
| <i>ffh</i>                               | 1000,0 | Белок сигнальной recognition particle            | Транспорт и усвоение питательных веществ | Транспорт белков через мембрану                                                  |
| <i>ftsY</i>                              | 127,7  | SRP-docking белок FtsY                           | Транспорт и усвоение питательных веществ | Транспорт белков через мембрану                                                  |
| <i>ecfA1</i>                             | 162,5  | АТР-связывающий белок ABC транспортера           | Транспорт и усвоение питательных веществ | Транспорт питательных веществ                                                    |
| <i>ecfA2</i>                             | 174,8  | АТР-связывающий белок ABC транспортера           | Транспорт и усвоение питательных веществ | Транспорт питательных веществ                                                    |
| <i>ecfT</i>                              | 104,4  | Трансмембранный белок EcfT                       | Транспорт и усвоение питательных веществ | Транспорт питательных веществ                                                    |

Таблица 5.2.3 – Список генов, экспрессирующихся в штамме *Pseudomonas chlororaphis* и потенциально связанных с усилением роста и защиты растений

| Название гена                                        | TPM   | Продукт гена                         | PGPB-функция                      | Обоснование                  |
|------------------------------------------------------|-------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Биосинтез фитогормонов и регуляторов роста           |       |                                      |                                   |                              |
| <i>trpA</i>                                          | 192,4 | триптофан синтаза альфа-субъединица  | синтез предшественника IAA        | биосинтез триптофана         |
| <i>trpB</i>                                          | 262,0 | триптофан синтаза бета-субъединица   | синтез предшественника IAA        | биосинтез триптофана         |
| <i>aroE</i>                                          | 74,3  | шикимат дегидрогеназа                | синтез предшественника IAA        | шикиматный путь              |
| Стрессоустойчивость и защита растений                |       |                                      |                                   |                              |
| <i>katE</i>                                          | 30,9  | каталаза HPII                        | защита от окислительного стресса  | активность каталазы          |
| <i>osmC</i>                                          | 98,5  | белок OsmC                           | окислительный/осмотический стресс | белок стрессового ответа     |
| <i>AEEGCL_00030</i>                                  | 56,8  | NADPH: хинон редуктаза               | защита от окислительного стресса  | восстановление хинонов       |
| <i>betC</i>                                          | 4,4   | холин-сульфатаза                     | осмопротекция                     | синтез глицин-бетаина        |
| <i>AEEGCL_00036</i>                                  | 12,3  | регулятор утилизации сульфата холина | регуляция осмопротекции           | метаболизм осмолитов         |
| <i>AEEGCL_00037</i>                                  | 51,6  | NADH-флавин редуктаза                | ответ на осмотический стресс      | редокс-баланс                |
| <i>hemF</i>                                          | 57,2  | копропорфириноген оксидаза           | синтез гема                       | функция цитохромов           |
| <i>aqpZ</i>                                          | 11,7  | аквапорин Z                          | транспорт воды                    | осмотическая регуляция       |
| <i>tsaC</i>                                          | 88,5  | L-треонилкарбамоиладенолат синтаза   | модификация тРНК                  | адаптация к стрессу          |
| <i>AEEGCL_00019</i>                                  | 36,4  | ДНК-3-метиладенин гликозилаза Tag    | репарация ДНК                     | ответ на стресс              |
| <i>AEEGCL_00061</i>                                  | 75,9  | карбоангидраза                       | регуляция pH                      | гидратация CO <sub>2</sub>   |
| Энергетический метаболизм и выживаемость в ризосфере |       |                                      |                                   |                              |
| <i>coxB</i>                                          | 77,8  | цитохром с оксидаза субъединица II   | энергетический метаболизм         | электрон-транспортная цепь   |
| <i>ctaD</i>                                          | 23,4  | цитохром с оксидаза субъединица I    | энергетический метаболизм         | электрон-транспортная цепь   |
| <i>glpP</i>                                          | 91,9  | глутамат/аспартат симпортер          | транспорт аминокислот             | усвоение питательных веществ |
| <i>gyrB</i>                                          | 264,9 | ДНК топоизомераза субъединица B      | метаболизм ДНК                    | синтез нуклеиновых кислот    |
| <i>recF</i>                                          | 84,5  | белок репликации/репарации ДНК       | репарация ДНК                     | стабильность генома          |
| Биосинтез аминокислот и кофакторов                   |       |                                      |                                   |                              |
| <i>glyS</i>                                          | 201,1 | глицин-тРНК лигаза бета              | синтез белка                      | синтез аминоксил-тРНК        |
| <i>glyQ</i>                                          | 251,6 | глицин-тРНК лигаза альфа             | синтез белка                      | синтез аминоксил-тРНК        |
| <i>AEEGCL_00083</i>                                  | 115,5 | гомосерин киназа                     | синтез аминокислот                | путь треонин/метионин        |
| Метаболизм липидов и мембран                         |       |                                      |                                   |                              |
| <i>AEEGCL_00020</i>                                  | 101   | лизофосфолипид ацилтрансфераза       | метаболизм липидов                | биосинтез мембран            |

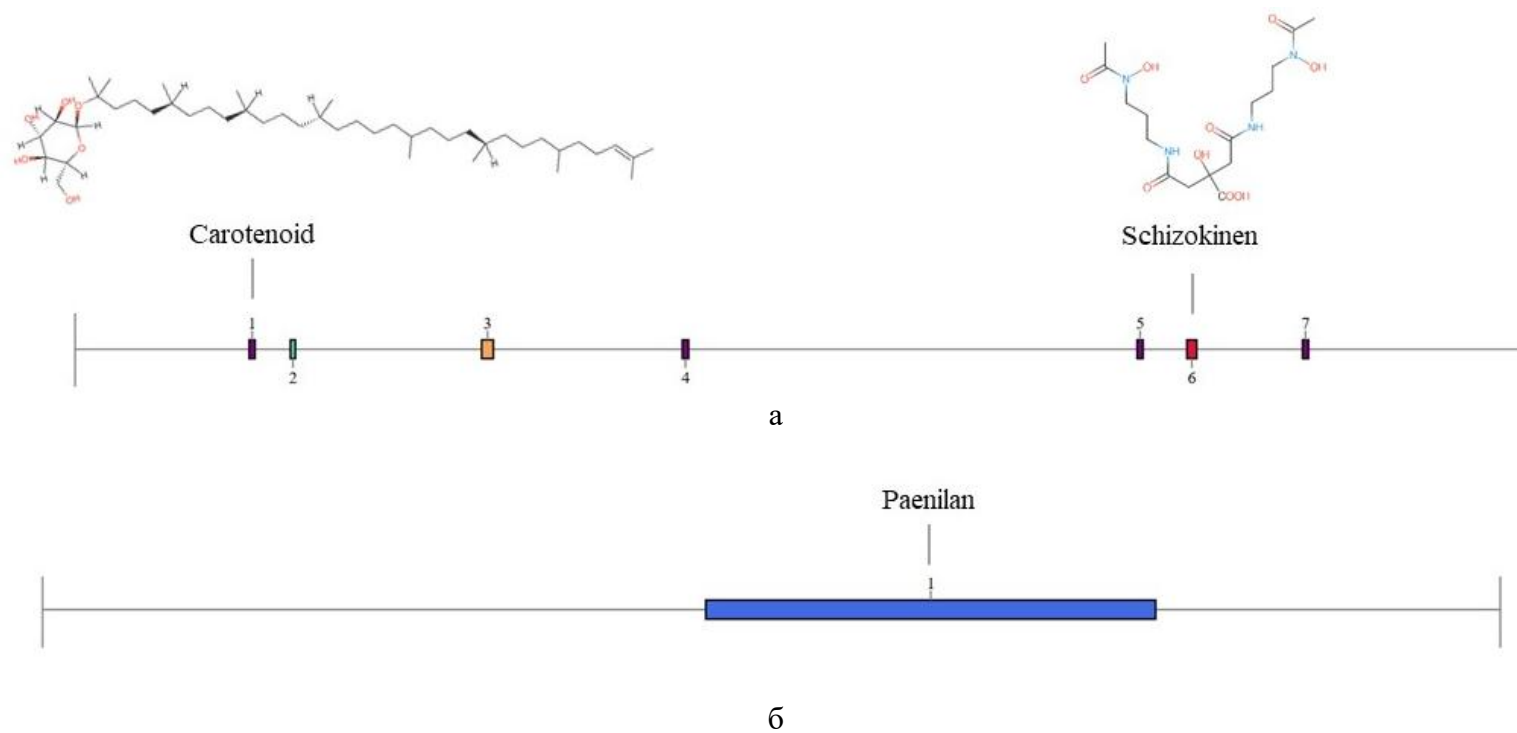
## Продолжение таблицы 5.2.3

| Название гена                            | TPM | Продукт гена                     | PGPB-функция                  | Обоснование                    |
|------------------------------------------|-----|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Транспорт и усвоение питательных веществ |     |                                  |                               |                                |
| <i>znuA</i>                              | 34  | система усвоения цинка ZnuA      | усвоение цинка                | высокоаффинный транспорт цинка |
| <i>znuB</i>                              | 28  | транспортер цинка ZnuB           | усвоение цинка                | пермеаза цинка                 |
| <i>znuC</i>                              | 35  | АТФ-связывающий белок цинка ZnuC | усвоение цинка                | ABC-транспортер цинка          |
| <i>fecR</i>                              | 27  | белок FecR                       | усвоение железа               | регуляция транспорта железа    |
| <i>AEEGCL_00133</i>                      | 8   | белок семейства FecR             | усвоение железа               | транспорт железа               |
| <i>trkA</i>                              | 39  | транспортер калия TrkA           | усвоение калия                | транспорт калия                |
| <i>AEEGCL_00005</i>                      | 86  | белок транспортной пермеазы      | транспорт питательных веществ | ABC-транспортер                |
| <i>AEEGCL_00006</i>                      | 120 | АТФ-связывающий ABC-транспортер  | транспорт питательных веществ | ABC-транспортер                |
| <i>spmA</i>                              | 44  | транспортер нуклеозидов          | транспорт нуклеозидов         | усвоение питательных веществ   |

Для оценки генетического потенциала штаммов к продукции ростостимулирующих и антимикробных веществ был проведен биоинформатический анализ с использованием платформы antiSMASH v. 8.0.4. Геномные последовательности в формате GenBank были подвергнуты автоматизированному поиску и аннотации кластеров генов биосинтеза. Интегрированные алгоритмы платформы позволили классифицировать выявленные локусы и спрогнозировать химическую структуру потенциальных вторичных метаболитов, определяющих ростостимулирующую активность исследуемых микроорганизмов [65].

Кластеры генов, представленные на рисунках и в таблицах, идентифицированы в геноме *Priestia aryabhatai* (рисунок 5.2.1 и таблица 5.2.4), *Bacillus subtilis* (рисунок 5.2.2 и таблица 5.2.5) и *Pseudomonas chlororaphis* (рисунок 5.2.3 и таблица 5.2.6) с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4. Согласно полученным данным, в геномах исследуемых штаммов обнаружены кластеры, ответственные за синтез сидерофоров и каротиноидов.

Сидерофоры ризосферных бактерий повышают обеспеченность растений железом, стимулируют рост и развитие культур, а также ограничивают развитие фитопатогенов за счёт конкурентного исключения по данному микроэлементу, что позволяет рассматривать их как важный фактор биоконтроля [36, 38]. Помимо этого, у бактерий симбиотического комплекса описана продукция каротиноидов – биологически активных пигментов, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами. Каротиноиды участвуют в защите бактериальных клеток от окислительного стресса и могут опосредованно повышать устойчивость симбиотической системы «растение–микроорганизм» к неблагоприятным абиотическим факторам, что положительно отражается на росте и физиологическом состоянии растений-хозяев [291]. Антимикробные соединения пептидной природы, такие как пазнилан, широко известны у представителей рода *Paenibacillus* и проявляют выраженную активность в отношении фитопатогенных микроорганизмов [117].



Примечание – а – contig\_1; б – contig\_2

Рисунок 5.2.1 – Кластеры генов, идентифицированные в геноме *Priestia aryabhatai* с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4

Таблица 5.2.4 – Результаты анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов *Priestia aryabhatai*

| 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        | terpene                                            | 611815–632663                | 20849                | Низкий           | carotenoid                | BGC0000647.3            | 69              | <i>Rhodobacter sphaeroides</i>         |
| 2        | phosphonate                                        | 757020–774441                | 17422                | –                | –                         | BGC0000897.5            | 48              | –                                      |
| 3        | T3PKS                                              | 1429311–1470396              | 41086                | –                | –                         | BGC0000282.3            | 54              | –                                      |
| 4        | terpene                                            | 2134911–2156779              | 21869                | –                | –                         | BGC0002173.2            | 47              | –                                      |
| 5        | terpene                                            | 3733803–3754621              | 20819                | –                | –                         | BGC0002084.4            | 56              | –                                      |
| 6        | Nl-siderophore                                     | 3908822–3943394              | 34573                | Низкий           | schizokinen               | BGC0002683.2            | 67              | <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 = FACHB-418 |
| 7        | terpene-precursor                                  | 4315451–4336347              | 20897                | –                | –                         | BGC0002283.2            | 49              | –                                      |
| contig_2 |                                                    |                              |                      |                  |                           |                         |                 |                                        |
| 1        | lanthipeptide-class-ii, cyclic-lactone-autoinducer | 36040–60489                  | 24450                | низкий           | paenilan                  | BGC0000504.5            | 49              | Plasmid pAD1                           |

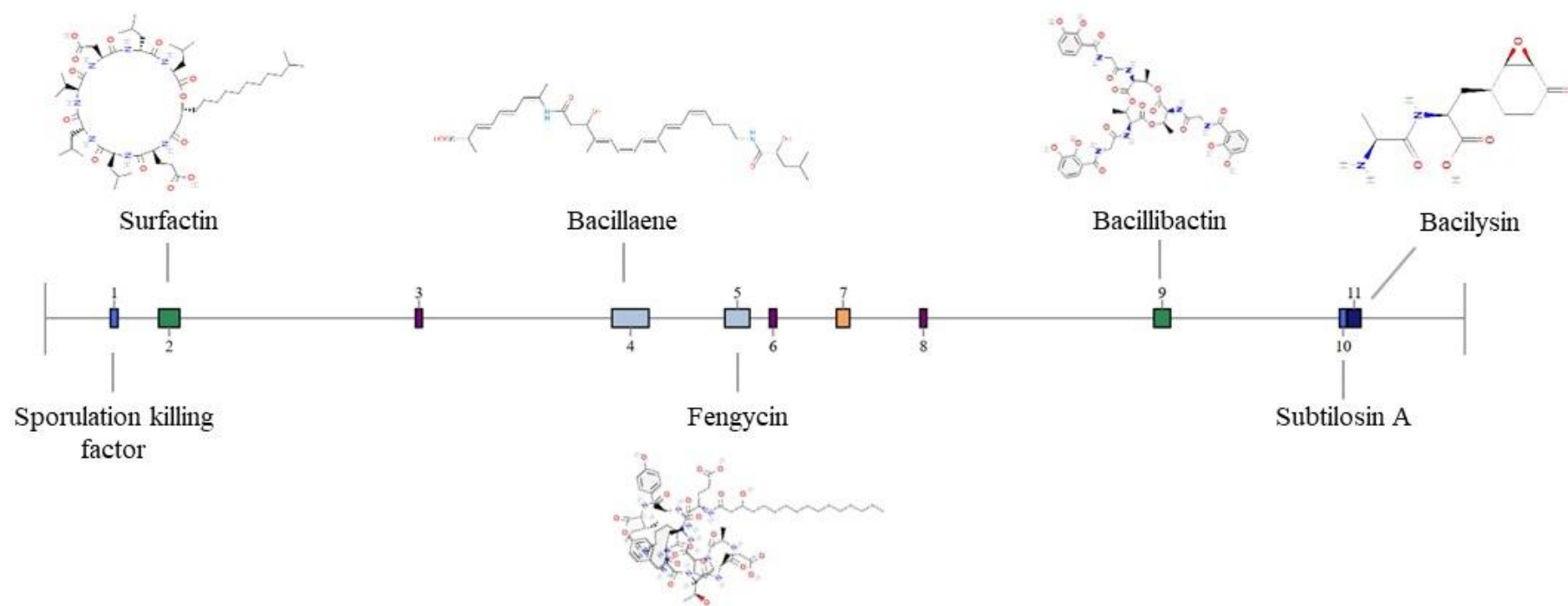


Рисунок 5.2.2 – Кластеры генов, идентифицированные в геноме *Bacillus subtilis* с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4

Таблица 5.2.5 – Результаты анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов *Bacillus subtilis*

| Регион | Тип                                | Расположение на геноме, п.н. | Длина кластера, п.н. | Уровень сходства | Похожий известный кластер  | Сравнение с базой MiBIG | Оценка сходства | Организм                                                    |
|--------|------------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------|----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------|
| 1      | sactipeptide, ranthipeptide        | 203317–226270                | 22954                | Высокий          | sporulation killing factor | BGC0000601.4            | 196             | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168    |
| 2      | NRPS                               | 353598–418989                | 65392                | Высокий          | surfactin                  | BGC0001833.4            | 75              | <i>Burkholderia gladioli</i>                                |
| 3      | terpene                            | 1154033–1174839              | 20807                | –                | –                          | BGC0002458.3            | 49              | –                                                           |
| 4      | transAT-PKS, PKS-like, T3PKS, NRPS | 1766082–1880854              | 114773               | Высокий          | bacillaene                 | BGC0002135.2            | 132             | <i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004                         |
| 5      | NRPS, betalactone                  | 2117672–2195421              | 77750                | Высокий          | fengycin                   | BGC0000407.5            | 99              | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>             |
| 6      | terpene                            | 2256737–2278635              | 21899                | –                | –                          | BGC0000313.4            | 36              | –                                                           |
| 7      | T3PKS                              | 2465619–2506716              | 41098                | –                | –                          | BGC0000282.3            | 49              | –                                                           |
| 8      | terpene-precursor                  | 2725946–2746836              | 20891                | –                | –                          | BGC0002283.2            | 49              | –                                                           |
| 9      | NRP-metallophore                   | 3454529–3506304              | 51776                | Высокий          | bacillibactin              | BGC0000309.5            | 152             | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168    |
| 10     | sactipeptide                       | 4033266–4054877              | 21612                | Высокий          | subtilosin A               | BGC0000602.5            | 90              | <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633 |
| 11     | other                              | 4058176–4099594              | 41419                | Высокий          | bacilysin                  | BGC0001184.4            | 84              | <i>Bacillus velezensis</i> FZB42                            |

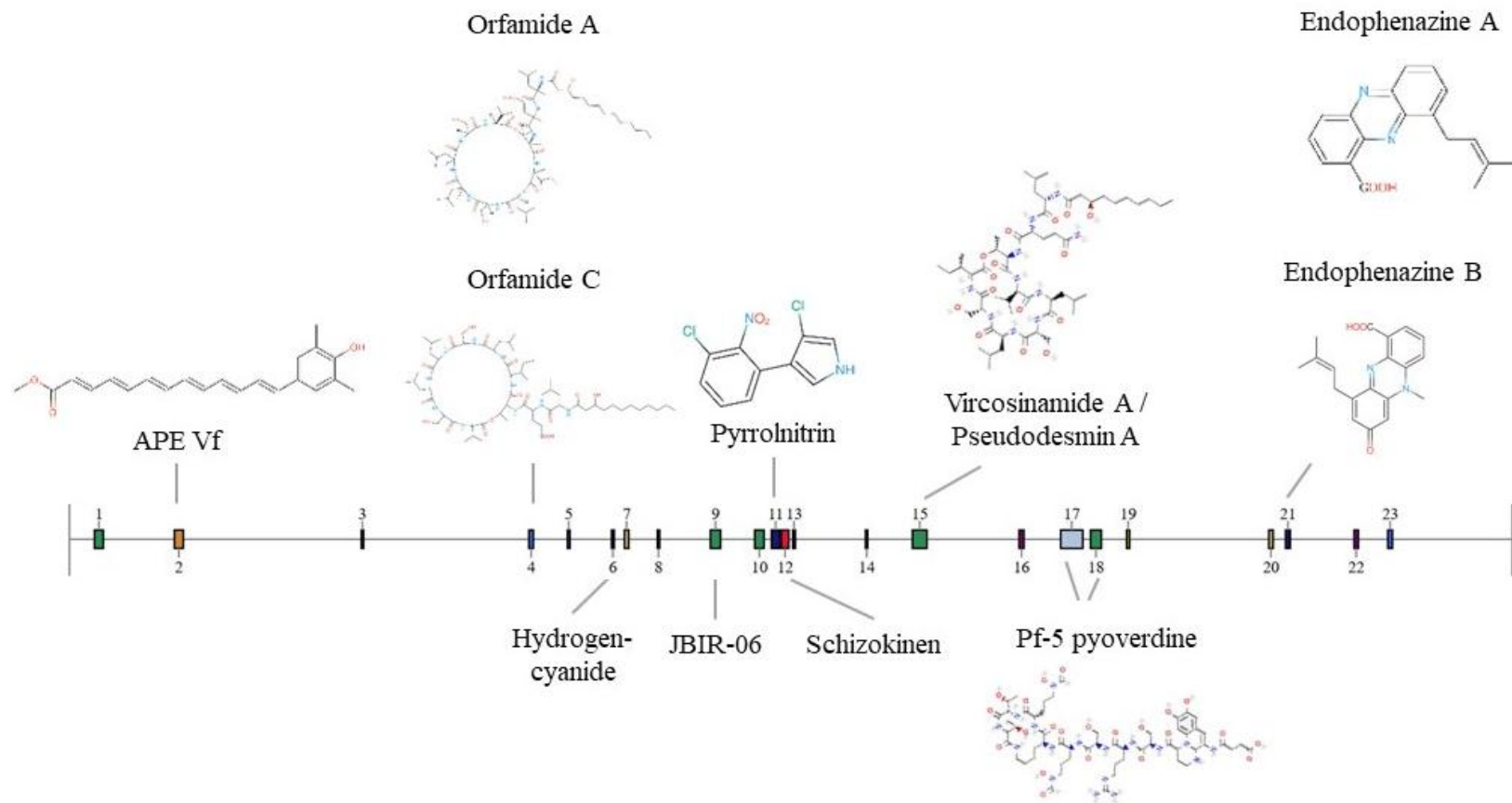


Рисунок 5.2.3 – Кластеры генов, идентифицированные в геноме *Pseudomonas chlororaphis* с использованием программного обеспечения antiSMASH версии 8.0.4

Таблица 5.2.6 – Результаты анализа кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов *Pseudomonas chlororaphis*

| Регион | Тип              | Расположение на геноме, п.н. | Длина кластера, п.н. | Уровень сходства | Похожий известный кластер        | Сравнение с базой MiBIG | Оценка сходства | Организм                                |
|--------|------------------|------------------------------|----------------------|------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------------------------|
| 1      | NRPS-like        | 123650–167081                | 43432                | –                | –                                | BGC0001641.4            | 62              | –                                       |
| 2      | arylpolyene      | 517629–561249                | 43621                | Низкий           | APE Vf                           | BGC0002341.2            | 75              | <i>Planctomycetales bacterium</i> 10988 |
| 3      | RiPP-like        | 1438384–1449277              | 10894                | –                | –                                | BGC0000558.5            | 42              | –                                       |
| 4      | darobactin       | 2264012–2285475              | 21464                | Низкий           | orfamide A / orfamide C          | BGC0001273.3            | 52              | <i>Aspergillus ochraceus</i>            |
| 5      | RiPP-like        | 2453636–2465837              | 12202                | –                | –                                | BGC0002660.2            | 35              | –                                       |
| 6      | hydrogen-cyanide | 2671117–2684089              | 12973                | Высокий          | hydrogen-cyanide                 | BGC0002345.2            | 85              | <i>Pseudomonas fluorescens</i>          |
| 7      | hserlactone      | 2734861–2755520              | 20660                | –                | –                                | BGC0002334.3            | 38              | –                                       |
| 8      | RiPP-like        | 2896869–2907753              | 10885                | –                | –                                | BGC0000556.5            | 33              | –                                       |
| 9      | NRPS             | 3157915–3207967              | 50053                | Низкий           | JBIR-06                          | BGC0002135.2            | 73              | <i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004     |
| 10     | NRPS             | 3376460–3421982              | 45523                | –                | –                                | BGC0001128.4            | 64              | –                                       |
| 11     | other            | 3458864–3499946              | 41083                | Высокий          | pyrrolnitrin                     | BGC0000924.5            | 98              | <i>Pseudomonas chlororaphis</i>         |
| 12     | Nl-siderophore   | 3507504–3544473              | 36970                | Низкий           | schizokinen                      | BGC0000946.5            | 62              | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>          |
| 13     | hydrogen-cyanide | 3563495–3576342              | 12848                | –                | –                                | BGC0000513.3            | 41              | –                                       |
| 14     | ectoin           | 3922380–3932739              | 10360                | –                | –                                | BGC0000852.5            | 44              | –                                       |
| 15     | NRPS             | 4153183–4224656              | 71474                | Высокий          | vircosinamide A / pseudodesmin A | BGC0002522.3            | 84              | <i>Pseudomonas</i> sp.                  |
| 16     | betalactone      | 4678865–4702115              | 23251                | –                | –                                | BGC0002193.2            | 56              | –                                       |

Продолжение таблицы 5.2.6

| Регион | Тип                                               | Расположение на геноме, п.н. | Длина кластера, п.н. | Уровень сходства | Похожий известный кластер         | Сравнение с базой MiBIG | Оценка сходства | Организм                            |
|--------|---------------------------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| 17     | NRP-metallophore, NRPS, resorcinol, ranthipeptide | 4883680–4992320              | 108641               | Низкий           | Pf-5 pyoverdine                   | BGC0001833.4            | 89              | <i>Burkholderia gladioli</i>        |
| 18     | NRPS                                              | 5031068–5084084              | 53017                | Низкий           | Pf-5 pyoverdine                   | BGC0002135.2            | 73              | <i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004 |
| 19     | NAGGN                                             | 5208751–5223431              | 14681                | —                | —                                 | BGC0001880.3            | 45              | —                                   |
| 20     | hserlactone                                       | 5909425–5930105              | 20681                | —                | —                                 | BGC0001987.2            | 47              | —                                   |
| 21     | hserlactone, phenazine                            | 5991847–6014634              | 22788                | Низкий           | endophenazine A / endophenazine B | BGC0000936.5            | 120             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1  |
| 22     | terpene-precursor                                 | 6329218–6350105              | 20888                | —                | —                                 | BGC0002283.2            | 50              | —                                   |
| 23     | redox-cofactor                                    | 6495689–6517857              | 22169                | —                | —                                 | BGC0000919.5            | 44              | —                                   |

Современные исследования показывают, что широкий спектр вторичных метаболитов, продуцируемых растительно-ассоциированными бактериями, играет важную роль в стимуляции роста растений и биологическом контроле фитопатогенов. Так, APE Vf-подобные соединения и сидерофоры, к которым относится шизокинен, обеспечивают эффективное связывание и транспорт железа, повышая его доступность для растения и одновременно ограничивая развитие фитопатогенных микроорганизмов за счёт конкуренции за данный микроэлемент. Известно, что продуцирование сидерофоров является одним из ключевых механизмов ростостимулирующего и антагонистического действия ризобактерий [203]. Пирролнитрин является хорошо изученным вторичным метаболитом с сильным противогрибковым действием, способным ингибировать рост возбудителей корневых и листовых болезней растений, что опосредованно способствует повышению продуктивности культур [244, 245].

Липопептидные соединения, такие как орфамид А и орфамид С, а также виркозинамид А и псевдодесмин А, известны своей антимикробной активностью и способностью нарушать целостность клеточных мембран фитопатогенов. Данные соединения широко описаны у ризосферных бактерий и рассматриваются как перспективные молекулы для биологической защиты растений [305]. Сидерофор пиовердин обеспечивает улучшение железного питания растений и подавляет патогенов за счёт депривации железа в микробном сообществе ризосферы [55]. Феназиновые производные, включая эндофеназин А и эндофеназин В, характеризуются выраженной антибиотической активностью и участвуют в формировании супрессивной к патогенам микробиоты почвы, что снижает инфекционную нагрузку на растения [229].

### 5.3 Сопоставление фенотипических, геномных и транскриптомных данных

Расхождение между результатами фенотипических и молекулярно-генетических исследований может быть обусловлено различиями в специфичности и чувствительности используемых методов. Некоторые культуральные тесты основаны на регистрации интегрального изменения состава среды, окраски, оптической плотности или характера роста микроорганизма. Такие показатели могут зависеть не только от исследуемого процесса, но и от образования сопутствующих метаболитов, изменения pH, состава культуральной жидкости и физиологического состояния клеток. Вследствие этого нельзя полностью исключить получение ложноположительных результатов.

Другой причиной является использование косвенных критериев оценки. Наблюдаемый фенотипический эффект может подтверждать наличие определённой активности, но не всегда позволяет установить конкретный биохимический механизм её формирования. Один и тот же результат может быть обусловлен несколькими метаболическими процессами. Поэтому фенотип, первоначально связанный с определённым геном или ферментом, в действительности может формироваться за счёт альтернативного пути.

На результаты также могут влиять гетерогенность бактериальной популяции, длительное субкультивирование, утрата мобильных генетических элементов и изменение физиологического состояния клеток. Отдельные субпопуляции одного штамма могут различаться по уровню метаболической активности. Расхождения могут быть обусловлены и ограничениями биоинформатического анализа. Функционально значимые последовательности с низкой степенью сходства могут оставаться нераспознанными или аннотироваться как гипотетические белки.

При использовании культурально-зависимого метода у всех трёх изолятов было установлено накопление общего азота в культуральной жидкости после выращивания на среде без внесённых азотсодержащих компонентов. Содержание общего азота составляло 189,2 мкг/см<sup>3</sup> для *Priestia aryabhattai*, 174,8 мкг/см<sup>3</sup> для

*Bacillus subtilis* и 194,0 мкг/см<sup>3</sup> для *Pseudomonas chlororaphis*. Полученные значения первоначально рассматривались как показатель потенциальной азотфиксирующей активности.

Вместе с тем в представленных результатах геномного анализа не показано наличие у исследуемых изолятов функционально полного комплекса *nif*-генов, кодирующих компоненты нитрогеназы и вспомогательные белки её сборки. В транскриптомных данных также не представлены транскрипты *nifH*, *nifD*, *nifK* и других генов, непосредственно связанных с восстановлением молекулярного азота. Таким образом, культуральный результат не получил прямого подтверждения на геномно-транскриптомном уровне.

Выявленное расхождение может быть обусловлено интегральным характером использованного культурального метода. Определение общего азота не позволяет установить источник обнаруженных азотсодержащих соединений. На результат могли влиять остаточный азот инокулята, внутриклеточные запасы, компоненты погибших клеток и особенности матрицы культуральной жидкости. Поэтому полученные значения следует характеризовать как накопление общего азота при культивировании на среде без внесённых азотсодержащих компонентов, а не прямое количественное доказательство фиксации N<sub>2</sub>.

Одновременно у исследуемых изолятов установлена способность накапливать аммиак. Наиболее высокие значения получены для *Bacillus subtilis* и *Priestia aryabhattai* – соответственно 307,2 и 297,5 мкг/см<sup>3</sup>; для В-216 показатель составлял 185,9 мкг/см<sup>3</sup>. В геномах и транскриптомах изолятов выявлены многочисленные гены общего азотного и аминокислотного метаболизма. Например, у *Priestia aryabhattai* обнаружены транскрипты *cysE*, *cysS*, *gltX* и *proS*; у *Bacillus subtilis* – *gltX*, *proS* и гены биосинтеза кофакторов; у В-216 – *gltP* и гены биосинтеза аминокислот.

Наличие этих транскриптов согласуется с активным обменом азотсодержащих соединений, но не указывает на первичный источник азота.

В представленных перечнях транскрибируемых генов *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* не выделены специфические

детерминанты, позволяющие установить конкретный механизм растворения фосфатов. Фенотипический эффект мог быть связан с образованием органических кислот, выделением протонов, подкислением среды или активностью фосфатаз. Гены и транскрипты общего энергетического и углеводного метаболизма могут косвенно участвовать в этих процессах, однако их присутствие неспецифично и не может рассматриваться как самостоятельное подтверждение фосфатсолюбилизации.

Способность к солюбилизации труднорастворимых соединений цинка культуральным методом была установлена только для *Bacillus subtilis*. В то же время у *Pseudomonas chlororaphis*, не проявившего данный фенотипический признак, выявлены транскрипты *znuA*, *znuB* и *znuC*. Продукты *znuABC* формируют высокоаффинную систему транспорта растворённого  $Zn^{2+}$  через клеточную мембрану. Такая система обеспечивает поглощение уже доступного иона, но не его высвобождение из труднорастворимого соединения во внешней среде. Поэтому наличие *znuABC* у *Pseudomonas chlororaphis* не противоречит отрицательному результату культурального теста на солюбилизацию цинка.

Для *Bacillus subtilis*, напротив, фенотипическая способность к мобилизации цинка не получила однозначного объяснения на основании представленной геномно-транскриптомной выборки. Возможный механизм может включать образование органических кислот или других хелатирующих соединений. Для его установления необходимо определить изменение pH культуральной жидкости и провести анализ профиля органических кислот.

При культуральном исследовании все три изолята продемонстрировали способность к накоплению индолил-3-уксусной кислоты. Для *Priestia aryabhatai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* данный показатель соответствовал диапазону 5,1–9,0 мкг/см<sup>3</sup>. Изолят *Priestia aryabhatai* также характеризовался более высоким баллом по продукции гиббереллиновой кислоты по сравнению с *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis*.

Наиболее выраженная взаимосвязь фенотипических и транскриптомных результатов в отношении ИУК установлена для *Pseudomonas chlororaphis*. В его транскриптоме выявлены *trpA* и *trpB*, кодирующие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы

триптофансинтазы, а также *aroE*, кодирующий шикиматдегидрогеназу. Продукты этих генов участвуют в биосинтезе триптофана и ароматических аминокислот. Поскольку триптофан является предшественником ряда путей микробного образования ИУК, выявленные транскрипты подтверждают активность метаболизма потенциального предшественника.

Вместе с тем *trpA*, *trpB* и *aroE* не являются специфическими генами образования ИУК. Они участвуют в основном метаболизме ароматических аминокислот, а триптофан может использоваться для синтеза белка и других соединений. Поэтому сочетание культурального обнаружения ИУК и транскрипции генов биосинтеза триптофана следует рассматривать как частичное подтверждение возможного механизма, но не как доказательство полного пути образования фитогормона.

В транскриптомах *Priestia aryabhatai* и *Bacillus subtilis* обнаружены гены *ispD*, *ispF* и *dxr*. Продукты данных генов участвуют в MEP-пути образования изопреноидов. Поскольку гиббереллины относятся к дитерпеноидным соединениям, функционирование MEP-пути обеспечивает образование общих изопреноидных предшественников.

Наиболее выраженное соответствие между культуральными и геномными результатами установлено для продуцирования сидерофоров. Культурально-зависимый анализ показал способность всех трёх изолятов образовывать сидерофороподобные соединения.

В геноме *Priestia aryabhatai* выявлен NIS-сидерофорный кластер длиной 34 573 п.н., сходный с кластером биосинтеза шизокинена. Выявление данного локуса согласуется с положительным культуральным тестом. При этом невысокий уровень сходства с референсным кластером не позволяет утверждать, что *Priestia aryabhatai* синтезирует именно шизокинен. Корректно говорить о наличии потенциального NIS-сидерофорного пути.

В геноме *Bacillus subtilis* обнаружен кластер NRP-металлофора с высоким сходством с кластером биосинтеза бациллибактина. Для данного

изолята положительный результат культурального теста согласуется с наличием генетически детерминированной системы биосинтеза сидерофора.

В геноме *Pseudomonas chlororaphis* выявлены NIS-сидерофорный кластер и несколько NRPS-областей, сходных с кластерами биосинтеза пиовердина. В транскриптоме дополнительно обнаружены *fecR* и ген семейства *fecR*, продукты которых участвуют в регуляции систем транспорта железа. Таким образом, для *Pseudomonas chlororaphis* согласуются три группы признаков: продукция сидерофороподобных соединений культуральным методом, наличие потенциальных сидерофорных кластеров и транскрипция генов регуляции железного транспорта.

Вместе с тем *fecR* характеризует регуляцию поглощения железа, а не непосредственно синтез сидерофора. В представленных транскриптомных таблицах не показана экспрессия полного набора структурных генов выявленных кластеров. Это может быть связано с условиями культивирования: синтез сидерофоров обычно активируется при дефиците доступного железа, тогда как биомассу для RNA-seq могли получать в среде, не индуцирующей соответствующие системы.

Следовательно, геномные и культуральные данные подтверждают сидерофорный потенциал всех трёх изолятов. Транскриптомные результаты для *Pseudomonas chlororaphis* дополнительно указывают на активность системы железного обмена. Высокая антагонистическая активность В-216 согласуется с наибольшим разнообразием выявленных биосинтетических кластеров. В его геноме обнаружено 23 потенциальных кластера вторичных метаболитов, включая локусы, сходные с кластерами биосинтеза пирролнитрина, феназинов, пиовердина, нерибосомных пептидов и липопептидов. Пирролнитрин и феназины обладают известным противогрибковым и антибактериальным потенциалом [229, 244, 245], тогда как пиовердиноподобные сидерофоры могут ограничивать доступность железа для конкурирующих микроорганизмов [55].

В геноме *Pseudomonas chlororaphis* также выявлены области, потенциально связанные с биосинтезом цианистого водорода. Этот результат может быть связан с выраженным антагонистическим потенциалом изолята, однако наличие кластера не подтверждает фактическую продукцию HCN. Концентрация цианида в

культуральной жидкости и газовой фазе в настоящей работе не определялась. Поэтому вклад HCN в подавление фитопатогенов и возможный риск при производстве препарата требуют отдельной экспериментальной оценки.

Изолят *Bacillus subtilis* проявлял выраженную активность в отношении *F. graminearum* F-877, *B. sorokiniana* F-529 и *X. campestris* B-4102. В его геноме выявлены кластеры сурфактина, фенгицина, бациллаена, субтилозина А и бацилизина. Наличие нескольких кластеров потенциально антимикробных метаболитов согласуется с выраженным антагонистическим фенотипом.

*Priestia aryabhattai* ингибировал все исследованные фитопатогены. В его геноме выявлены ТЗPKS, терпеноидные, пептидные и пазниланоподобные кластеры. В транскриптом обнаружены транскрипты генов, аннотированных как пептидная синтетаза и *solG*, однако их значения TPM были сравнительно невысокими.

Таким образом, для антагонистической активности установлена общая взаимосвязь между культуральным фенотипом и разнообразием потенциальных биосинтетических кластеров. Наиболее выраженное соответствие наблюдалось для *Pseudomonas chlororaphis* и *Bacillus subtilis*. Вместе с тем antiSMASH прогнозирует возможность биосинтеза, но не подтверждает образование конкретного соединения. Зона ингибирования также может быть обусловлена совокупным действием антибиотических соединений, сидерофоров, ферментов, летучих метаболитов, изменением pH и конкуренцией за питательные вещества.

На геномном уровне наличие *acdS*, кодирующего АЦК-деаминазу, у исследуемых изолятов в представленных результатах не подтверждено.

Таким образом, геномный и транскриптомный анализ позволили уточнить таксономическую принадлежность исследуемых штаммов и охарактеризовать их генетический и функциональный потенциал. Установлено, что *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* обладают механизмами, потенциально связанными со стимуляцией роста и защитой растений, включая поддержание стрессоустойчивости и метаболической активности, транспорт и усвоение питательных веществ, биосинтез регуляторов роста и вторичных метаболитов. Анализ биосинтетических кластеров дополнительно подтвердил способность исследуемых

штаммов к синтезу соединений, представляющих интерес с точки зрения ростостимулирующей и антагонистической активности. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о комплексном характере PGP-потенциала исследуемых ризобактерий и обосновывают перспективность их дальнейшего использования при разработке биологических препаратов для растениеводства.

#### 5.4 Заключение по главе 5

Проведен биоинформатический анализ генома и транскриптома штаммов бактерий, входящих в состав биопрепарата, что позволило выявить генетические механизмы, лежащие в основе их ростостимулирующей активности. На основе анализа филогенетических деревьев и геномных последовательностей было установлено, что штаммы, ранее идентифицированные как *Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 относятся к видам *Priestia aryabhatai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis* соответственно.

Транскриптомный анализ выявил, что для *Priestia aryabhatai* наиболее активны гены, связанные с энергетическим метаболизмом и стрессоустойчивостью, что обеспечивает косвенные PGP-механизмы через улучшение выживаемости в ризосфере. *Bacillus subtilis* характеризуется высокой стрессоустойчивостью и метаболической активностью. *Pseudomonas chlororaphis* демонстрирует высокую экспрессию генов, участвующих в биосинтезе аминокислот, кофакторов и фитогормонов. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что каждый из штаммов обладает уникальным набором PGP-функций, что делает их перспективными кандидатами для разработки комплексных биопрепаратов для стимуляции роста и защиты растений.

## **ГЛАВА 6 ПРАКТИЧЕСКАЯ РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Глава посвящена подбору рациональных параметров культивирования разработанного биопрепарата, определению эффективных доз применения для предпосевной обработки семян пшеницы, а также оценке качества, безопасности и стабильности препарата в процессе хранения. Особое внимание уделено исследованию жизнеспособности микроорганизмов, отсутствию цитотоксического и микробиологического риска и установлению срока годности. Кроме того, проведена экономическая оценка разработанного препарата, позволившая определить расчетную себестоимость, оптовую цену и затраты на обработку семенного материала, а также оценить перспективность его практического внедрения в сельскохозяйственное производство.

### **6.1 Подбор параметров культивирования биопрепарата**

Температура является одним из важных факторов, влияющих на рост и развитие микроорганизмов. Таким образом, необходим подбор рациональной температуры для повышения скорости роста штаммов.

При температуре 20 °С экспоненциальная фаза началась через 8 ч культивирования (оптическая плотность – 0,13), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 2,85. При температуре 24 °С начало экспоненциальной фазы наблюдали через 5 ч культивирования (оптическая плотность – 0,23), стационарная фаза – 18 ч (оптическая плотность – 2,31) на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 2,55. График подбора температуры культивирования биопрепарата представлен на рисунке 6.1.1.

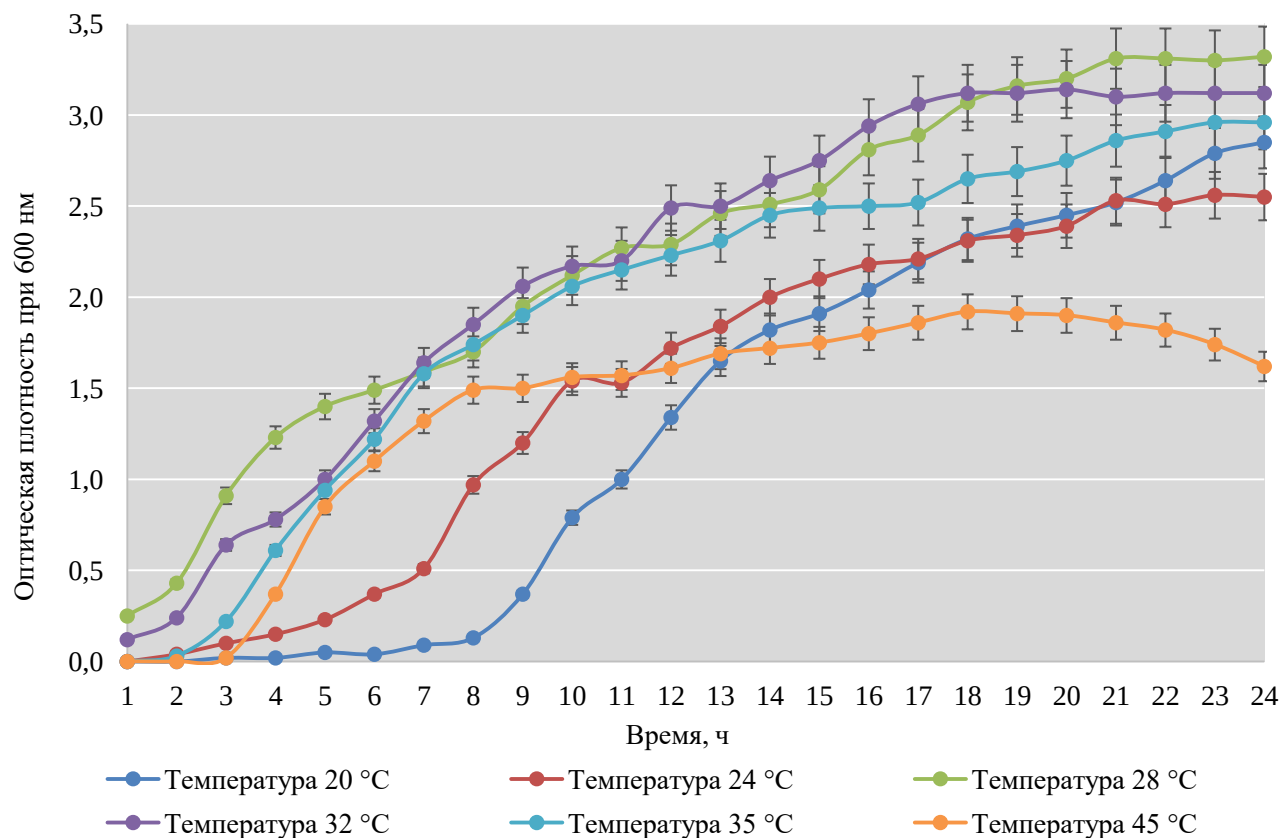


Рисунок 6.1.1 – Кривые роста биопрепарата в зависимости от температуры культивирования

При температуре 28 °C экспоненциальная фаза началась через 2 ч культивирования (оптическая плотность – 0,43), стационарная фаза – 21 ч (оптическая плотность – 3,31), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 3,32. При температуре 32 °C начало экспоненциальной фазы наблюдали через 2 ч культивирования (оптическая плотность – 0,24), стационарная фаза – 17 ч (оптическая плотность – 3,06), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 3,12. При температуре 35 °C экспоненциальная фаза началась через 3 ч культивирования (оптическая плотность – 0,22), стационарная фаза – 21 ч (оптическая плотность – 2,86), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 2,96. При температуре 45 °C экспоненциальная фаза началась через 4 ч культивирования (оптическая плотность – 0,37), стационарная фаза – 8 ч (оптическая плотность – 1,49), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 1,62. Таким образом, оптимальная температура культивирования для большего накопления биомассы составила 28 °C в течение 22–24 ч.

Способность штамма синтезировать соединения со специфическими свойствами зависит не только от самих микроорганизмов, но и от условий культивирования, в частности, от состава питательной среды. Определение оптимального состава питательной среды является необходимым этапом как для увеличения биомассы, так и для повышения синтеза биологически активных соединений [19]. Подбор основных компонентов питательной среды для культивирования биопрепарата представлен в таблице 6.1.1 и на рисунке 6.1.2.

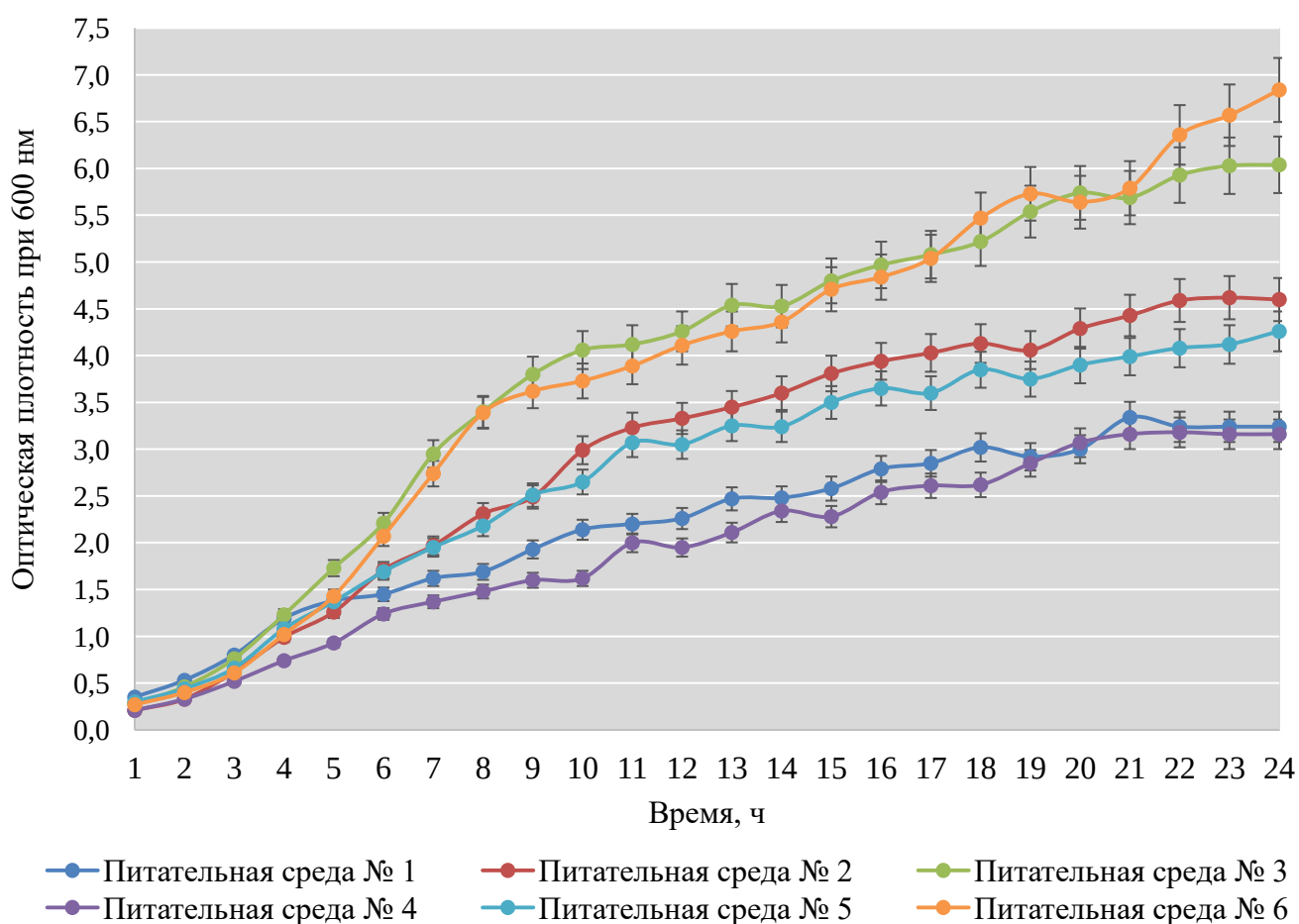


Рисунок 6.1.2 – Кривые роста биопрепарата в зависимости от состава основных компонентов питательной среды

Как видно из рисунка 6.1.2, на питательной среде № 1 экспоненциальная фаза началась через 2 ч культивирования (оптическая плотность – 0,53), стационарная фаза – 18 ч (оптическая плотность – 3,02), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 3,24. На среде № 2 начало экспоненциальной

фазы наблюдали через 2 ч культивирования (оптическая плотность – 0,33), стационарной фазы – через 21 ч (оптическая плотность – 4,43), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 4,60. На среде № 3 экспоненциальная фаза началась через 2 ч культивирования (оптическая плотность – 0,46), стационарная фаза – через 20 ч (оптическая плотность – 5,74), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 6,04. На среде № 4 начало экспоненциальной фазы наблюдали через 3 ч культивирования (оптическая плотность – 0,52), стационарной фазы – через 20 ч (оптическая плотность – 3,07), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 3,16.

На среде № 5 экспоненциальная фаза началась через 3 ч культивирования (оптическая плотность – 0,66), стационарная фаза – через 19 ч (оптическая плотность – 3,75), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 4,26. На среде № 6 начало экспоненциальной фазы наблюдали через 2 ч культивирования (оптическая плотность – 0,4), на 24 ч культивирования оптическая плотность составляла 6,84.

Полученные результаты демонстрируют значительное влияние состава питательной среды на ростостимулирующую активность биопрепарата. Концентрация индолил-3-уксусной кислоты варьировалась в диапазоне 13,0–23,8 мкг/см<sup>3</sup>, гиббереллиновой кислоты – в диапазоне 1,46–5,95 мг/см<sup>3</sup>, а уровень синтеза сидерофоров – в диапазоне 51,8–61,6 %. Наиболее высокие показатели ростостимулирующей активности наблюдали при культивировании биопрепарата на питательной среде № 6. Напротив, наименьшие значения, как правило, демонстрировали среды № 1 (16,3 мкг/см<sup>3</sup> ИУК; 1,46 мг/см<sup>3</sup> ГК; 56,7 % сидерофоров) и № 2 (13,0 мкг/см<sup>3</sup> ИУК; 2,08 мг/см<sup>3</sup> ГК; 51,8 % сидерофоров). Продуцирование ИУК значительно превышало показатели сред № 1 и № 2, что может указывать на наличие в составе среды № 6 необходимых предшественников. Показатели синтеза ГК также демонстрируют выраженную зависимость от состава среды, и высокие концентрации ГК, продуцируемые в среде № 6, могут способствовать стимуляции роста растений за счет активации процессов клеточного деления и растяжения (таблица 6.1.1).

Таблица 6.1.1 – Результаты ростостимулирующей активности биопрепарата в зависимости от состава основных компонентов питательной среды

| Образец               | ИУК, мкг/см <sup>3</sup> | ГК, мг/см <sup>3</sup>  | Сидерофоры, %           |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Питательная среда № 1 | 16,3 <sup>a</sup> ±0,4   | 1,46 <sup>a</sup> ±0,06 | 56,7 <sup>a</sup> ±2,0  |
| Питательная среда № 2 | 13,0 <sup>b</sup> ±0,5   | 2,08 <sup>b</sup> ±0,07 | 51,8 <sup>b</sup> ±1,7  |
| Питательная среда № 3 | 21,1 <sup>b</sup> ±0,8   | 3,30 <sup>b</sup> ±0,09 | 59,4 <sup>ab</sup> ±2,4 |
| Питательная среда № 4 | 17,7 <sup>f</sup> ±0,4   | 2,97 <sup>f</sup> ±0,10 | 58,5 <sup>ab</sup> ±1,8 |
| Питательная среда № 5 | 15,0 <sup>d</sup> ±0,5   | 3,95 <sup>d</sup> ±0,13 | 54,5 <sup>ab</sup> ±2,2 |
| Питательная среда № 6 | 23,8 <sup>y</sup> ±0,6   | 5,95 <sup>e</sup> ±0,24 | 61,6 <sup>c</sup> ±2,7  |

Примечание: Различия в буквенных индексах, расположенных справа от значений, показывают достоверность различий в пределах одного исследуемого параметра, рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе. При отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков.

Синтез сидерофоров варьировал в зависимости от состава среды. Среда № 3 (21,1 мкг/см<sup>3</sup> ИУК; 3,3 мг/см<sup>3</sup> ГК; 59,4 % сидерофоров), № 4 (17,7 мкг/см<sup>3</sup> ИУК; 2,97 мг/см<sup>3</sup> ГК; 58,5 % сидерофоров) и № 6 продемонстрировали сходные высокие показатели. Эти данные позволяют предположить, что высокое содержание определенных компонентов в среде №6 оказывает стимулирующее воздействие на метаболические пути, ответственные за синтез фитогормонов и сидерофоров.

Помимо основных источников питательных элементов разным видам микроорганизмов необходимы дополнительные нутриенты (витамины, макро- и микроэлементы и др.). Подбор основных дополнительных компонентов питательной среды для биопрепарата представлен в таблице 6.1.2 и на рисунке 6.1.3.

Согласно данным таблицы 6.1.2, выявлено влияние дополнительных компонентов питательной среды на ростостимулирующую активность биопрепарата. Концентрации ИУК варьировали в диапазоне 18,5–22,3 мкг/см<sup>3</sup>, ГК – 2,27–7,45 мг/см<sup>3</sup>, уровень синтеза сидерофоров – 42,9–62,1 %.

Наибольшие показатели продуцирования индолил-3-уксусной (22,3 мкг/см<sup>3</sup>) и гиббереллиновой кислот (7,45 мг/см<sup>3</sup>), сидерофоров (62,1 %) были зафиксированы для питательной среды № 1.1 (без добавления дополнительных компонентов). На среде с добавлением биотина (питательная среда № 2.1) отмечено ингибирование продуцирования гиббереллиновой кислоты (2,27 мг/см<sup>3</sup>).

На среде № 4.1 с добавлением всех исследуемых дополнительных компонентов (биотин,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ) отмечено ингибирование продуцирования индолил-3-уксусной кислоты ( $18,5 \text{ мкг/см}^3$ ) и сидерофоров (42,9 %).

Таблица 6.1.2 – Результаты ростостимулирующей активности биопрепарата в зависимости от состава дополнительных компонентов питательной среды

| Среда                   | ИУК, $\text{мкг/см}^3$ | ГК, $\text{мг/см}^3$ | Сидерофоров, %   |
|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------|
| Питательная среда № 1.1 | $22,3^a \pm 0,8$       | $7,45^a \pm 0,26$    | $62,1^a \pm 2,2$ |
| Питательная среда № 2.1 | $21,1^a \pm 0,6$       | $2,27^o \pm 0,06$    | $60,3^a \pm 2,6$ |
| Питательная среда № 3.1 | $18,9^a \pm 0,4$       | $5,27^b \pm 0,21$    | $50,5^o \pm 1,8$ |
| Питательная среда № 4.1 | $18,5^a \pm 0,6$       | $5,16^b \pm 0,23$    | $42,9^b \pm 1,5$ |

Примечание: Различия в буквенных индексах, расположенных справа от значений, показывают достоверность различий между растениями (в пределах одного исследуемого параметра), рассчитанную методом ANOVA с апостериорным критерием Шеффе. При отсутствии достоверных различий буквенный индекс одинаков.

Анализ роста биопрепарата в зависимости от состава дополнительных компонентов питательной среды (рисунок 6.1.3) показал, что время наступления экспоненциальной фазы варьировалось от 3 часов (среда № 1.1 и № 2.1) до 8 часов (среда № 4.1), а максимальная оптическая плотность через 24 часа культивирования варьировалась от 2,20 (среда № 4.1) до 6,39 (среда № 2.1). Важно отметить, что данные по оптической плотности через 24 часа не полностью коррелируют с результатами анализа ростостимулирующей активности. Хотя питательная среда № 2.1 обеспечила самую высокую плотность биомассы (оптическая плотность 6,39), наибольшие концентрации ИУК, ГК и сидерофоров были достигнуты на питательной среде № 1.1. Это говорит о том, что среда, благоприятствующая росту биомассы, необязательно стимулирует максимальное производство ростостимулирующих веществ. Вероятно, компоненты питательной среды № 1.1, несмотря на более медленный рост, более эффективно перенаправляют метаболизм биопрепарата в синтез ИУК, ГК и сидерофоров.

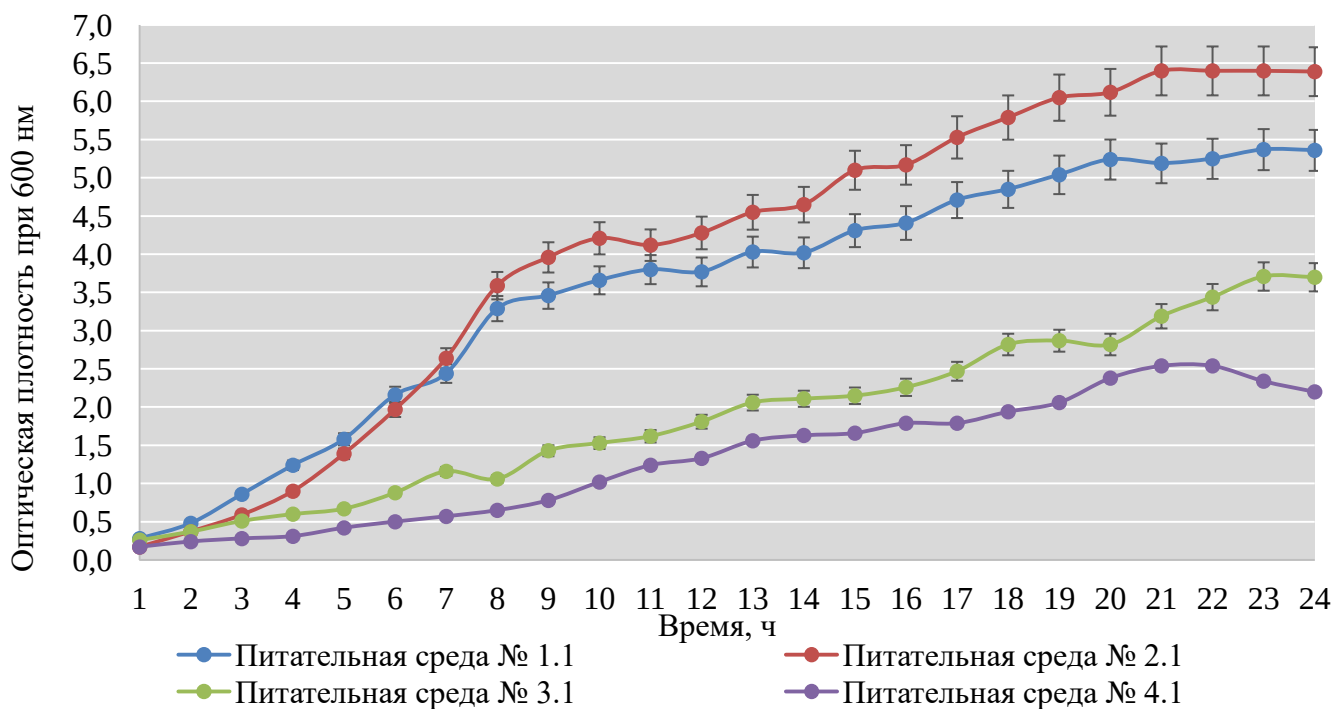


Рисунок 6.1.3 – Кривые роста биопрепарата в зависимости от состава дополнительных компонентов питательной среды

Таким образом, параметры получения биологического препарата, обеспечивающие максимальное накопление биомассы и показатели активности: продолжительность культивирования: 22–24 ч, температура: 28–30 °С, питательная среда следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; натрий хлористый – 10; меласса – 6; мочевины – 1.

## 6.2 Подбор рациональных доз внесения биопрепарата

Для определения перспективности использования разработанного биологического препарата необходимо провести лабораторную апробацию (рисунок 6.2.1) биологического препарата, полученного при оптимальных параметрах культивирования, а также входящих в его состав штаммов ризобактерий.



Контроль без обработки

Азофит

Биопрепарат

Рисунок 6.2.1 – Лабораторная апробация биопрепарата

Результаты исследования способности биопрепарата и штаммов, входящих в его состав, стимулировать рост и развитие яровой мягкой пшеницы сорта Экстра в лабораторных условиях представлены в таблице 6.2.1.

Таблица 6.2.1 – Лабораторная апробация биопрепарата и штаммов, входящих в его состав, на яровой мягкой пшенице сорта Экстра

| Образец      | Энергия прорастания, % | Всхожесть, %         | Средняя длина ростка, мм | Средняя сухая масса одного ростка, мг |
|--------------|------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Вариант К1   | 28±1 <sup>аб</sup>     | 69±2 <sup>аб</sup>   | 159±6 <sup>аб</sup>      | 22,5±0,6 <sup>а</sup>                 |
| Вариант К2   | 26±2 <sup>а</sup>      | 70±2 <sup>бв</sup>   | 163±5 <sup>аб</sup>      | 28,6±0,8 <sup>б</sup>                 |
| Вариант Ш1.1 | 32±1 <sup>аб</sup>     | 74±3 <sup>гд</sup>   | 167±6 <sup>аб</sup>      | 40,2±1,5 <sup>в</sup>                 |
| Вариант Ш2.1 | 29±1 <sup>аб</sup>     | 66±2 <sup>авде</sup> | 170±5 <sup>бв</sup>      | 39,0±1,1 <sup>в</sup>                 |
| Вариант Ш3.1 | 26±1 <sup>а</sup>      | 55±1 <sup>ж</sup>    | 165±3 <sup>аб</sup>      | 32,4±1,3 <sup>бг</sup>                |
| Вариант Б1.1 | 31±2 <sup>аб</sup>     | 70±2 <sup>бв</sup>   | 162±7 <sup>аб</sup>      | 50,8±1,8 <sup>де</sup>                |
| Вариант Ш1.2 | 30±1 <sup>аб</sup>     | 75±1 <sup>бд</sup>   | 170±6 <sup>бв</sup>      | 42,2±1,2 <sup>вж</sup>                |
| Вариант Ш2.2 | 31±2 <sup>аб</sup>     | 71±4 <sup>бв</sup>   | 165±4 <sup>аб</sup>      | 46,5±1,8 <sup>дж</sup>                |
| Вариант Ш3.2 | 31±2 <sup>аб</sup>     | 64±1 <sup>авж</sup>  | 155±5 <sup>аб</sup>      | 37,3±1,5 <sup>вг</sup>                |
| Вариант Б1.2 | 33±1 <sup>б</sup>      | 78±2 <sup>б</sup>    | 172±3 <sup>б</sup>       | 54,8±2,0 <sup>е</sup>                 |
| Вариант Ш1.3 | 26±1 <sup>а</sup>      | 58±1 <sup>еж</sup>   | 150±5 <sup>ав</sup>      | 29,3±0,8 <sup>б</sup>                 |
| Вариант Ш2.3 | 28±1 <sup>аб</sup>     | 60±4 <sup>аж</sup>   | 156±6 <sup>аб</sup>      | 31,7±1,0 <sup>б</sup>                 |
| Вариант Ш3.3 | 30±2 <sup>аб</sup>     | 65±1 <sup>авге</sup> | 148±2 <sup>а</sup>       | 30,3±0,6 <sup>б</sup>                 |
| Вариант Б1.3 | 27±1 <sup>аб</sup>     | 69±2 <sup>аб</sup>   | 161±6 <sup>аб</sup>      | 32,2±1,3 <sup>бг</sup>                |

Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Инокуляция семян пшеницы сорта Экстра биопрепаратом продемонстрировала высокую эффективность по сравнению с контрольной группой (обработка дистиллированной водой и обработка микробным препаратом «Азофит»).

Наиболее эффективной являлась обработка биопрепаратом в концентрации 2 дм<sup>3</sup>/т семян. Этот вариант продемонстрировал лучшие результаты по всем исследуемым показателям. Так, увеличилась энергия прорастания на 4 и 6 % по сравнению с вариантами К1 и К2 соответственно; всхожесть – на 9 и 8 %; средняя длина ростка – на 13 и 9 мм; средняя сухая масса одного ростка – на 32,3 и 26,2 мг.

Изучение воздействия различных штаммов и биопрепарата на уровень пигментов и азота в наземной части пшеницы поможет глубже понять их влияние на растения и оценить их потенциал для повышения урожайности и качества зерна. Результаты определения хлорофилла, каротиноидов и азота представлены в таблице 6.2.2.

Таблица 6.2.2 – Содержание общего хлорофилла, каротиноидов и азота в наземной части яровой мягкой пшеницы сорта Экстра

| Образец       | Общий хлорофилл, мг/г сухой массы | Каротиноиды, мг/г сухой массы | Азот, мг/г сухой массы   |
|---------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Вариант К1    | 6,41±0,22 <sup>а</sup>            | 1,18±0,03 <sup>аб</sup>       | 35,5±1,2 <sup>а</sup>    |
| Вариант К2    | 8,10±0,15 <sup>аб</sup>           | 1,06±0,04 <sup>а</sup>        | 39,3±1,4 <sup>абвг</sup> |
| Вариант Ш 1.1 | 13,25±0,54 <sup>вг</sup>          | 2,15±0,05 <sup>вг</sup>       | 43,0±1,8 <sup>бвгд</sup> |
| Вариант Ш 2.1 | 10,16±0,44 <sup>бде</sup>         | 1,36±0,04 <sup>бд</sup>       | 45,6±1,6 <sup>бвд</sup>  |
| Вариант Ш 3.1 | 12,47±0,57 <sup>вгд</sup>         | 0,96±0,04 <sup>аб</sup>       | 41,4±1,7 <sup>абвг</sup> |
| Вариант Б 1.1 | 16,12±0,69 <sup>ж</sup>           | 1,20±0,06 <sup>вс</sup>       | 49,9±2,1 <sup>де</sup>   |
| Вариант Ш 1.2 | 15,13±0,58 <sup>з</sup>           | 1,91±0,06 <sup>ж</sup>        | 46,4±2,2 <sup>бде</sup>  |
| Вариант Ш 2.2 | 14,37±0,59 <sup>вз</sup>          | 2,25±0,07 <sup>ж</sup>        | 53,1±1,8 <sup>сж</sup>   |
| Вариант Ш 3.2 | 15,97±0,64 <sup>ж</sup>           | 2,29±0,04 <sup>гж</sup>       | 50,3±2,0 <sup>де</sup>   |
| Вариант Б 1.2 | 18,10±0,81 <sup>и</sup>           | 3,13±0,10 <sup>з</sup>        | 57,8±2,2 <sup>ж</sup>    |
| Вариант Ш 1.3 | 9,51±0,35 <sup>бе</sup>           | 1,61±0,04 <sup>дн</sup>       | 36,2±1,4 <sup>аг</sup>   |
| Вариант Ш 2.3 | 9,40±0,27 <sup>бе</sup>           | 0,98±0,03 <sup>а</sup>        | 38,6±1,8 <sup>абвг</sup> |
| Вариант Ш 3.3 | 6,71±0,19 <sup>а</sup>            | 1,83±0,06 <sup>си</sup>       | 37,9±1,5 <sup>аг</sup>   |
| Вариант Б 1.3 | 11,49 ±0,31 <sup>где</sup>        | 2,04±0,05 <sup>вге</sup>      | 41,1±1,6 <sup>абвг</sup> |

Примечание: Различные буквенные индексы обозначают статистически значимые различия между вариантами по критерию Шеффе при  $p \leq 0,05$

Полученные в таблице 6.2.2 результаты демонстрируют влияние различных вариантов обработки семян яровой мягкой пшеницы сорта Экстра на содержание

общего хлорофилла, каротиноидов и азота в наземной части растений. Содержание общего хлорофилла варьировалось от 6,41 до 18,10 мг/г сухой массы, каротиноидов – от 0,96 до 3,13 мг/г сухой массы, азота – от 35,5 до 57,8 мг/г сухой массы.

Наибольшие значения всех трёх показателей отмечены в варианте Б1.2, предусматривающем инокуляцию семян биопрепаратом в дозе 2 дм<sup>3</sup>/т. Содержание общего хлорофилла в этом варианте составило 18,10±0,81 мг/г сухой массы, каротиноидов – 3,13±0,10 мг/г сухой массы, азота – 57,8±2,2 мг/г сухой массы. По сравнению с вариантом К1 значения были выше соответственно на 182,4; 165,3 и 62,8 %, а по сравнению с вариантом К2 – на 123,5; 195,3 и 47,1 %.

Увеличение дозы препарата с 2 до 3 дм<sup>3</sup>/т сопровождалось снижением содержания общего хлорофилла с 18,10 до 11,49 мг/г сухой массы. Относительно варианта Б1.2 снижение составило 36,5; 34,8 и 28,9 % соответственно и было статистически значимым. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии обработки биопрепаратом на исследуемые физиолого-биохимические показатели яровой пшеницы сорта Экстра. Оптимальной дозой для обработки семян является 2 дм<sup>3</sup>/т, обеспечивающая максимальное содержание хлорофилла, каротиноидов и азота в наземной части растений.

### **6.3 Оценка безопасности и срока годности биопрепарата**

Обеспечение экологической безопасности и высокой агрономической эффективности микробиологических средств является приоритетным условием их внедрения в современное сельское хозяйство. В связи с этим критически важным этапом оценки качества разработанного биопрепарата выступает его комплексная аттестация по критериям биологической активности и санитарно-токсикологической чистоты.

Оценка показателей качества и безопасности разработанного биопрепарата представлена в таблице 6.3.1. Разработанный биопрепарат характеризуется высокой концентрацией жизнеспособных клеток, не менее  $1 \times 10^9$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Таблица 6.3.1 – Результаты определения показателей качества и безопасности биопрепарата

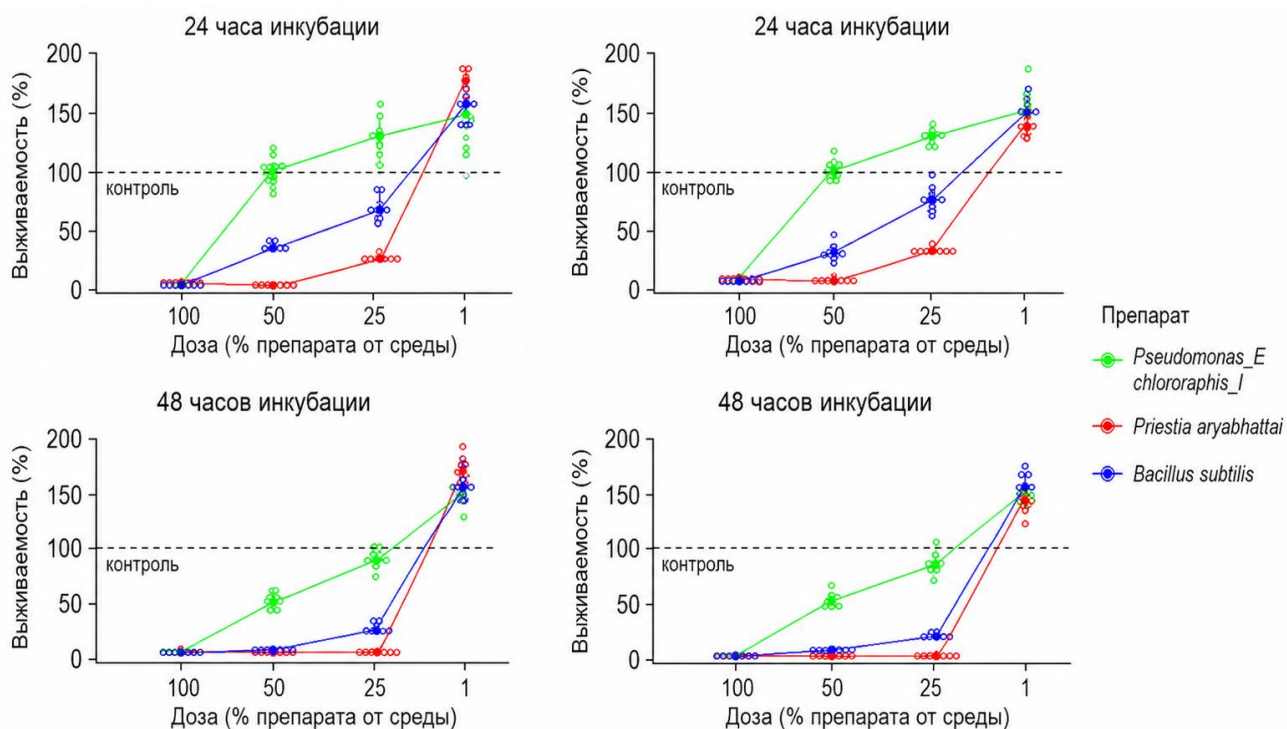
| Показатель                                                                                                                                                                                                    | Норма                               | Значение                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|
| Количество жизнеспособных клеток, не менее                                                                                                                                                                    | $1 \times 10^9$ КОЕ/см <sup>3</sup> | $5 \times 10^{10}$ КОЕ/см <sup>3</sup>       |
| Массовая концентрация примесей отдельных токсичных элементов (валовое содержание), мг/кг сухого вещества, не более:<br>– свинца<br>– кадмия<br>– ртути<br>– мышьяка                                           | 130,0<br>2,0<br>2,1<br>10,0         | Не обнаружено на уровне определения методики |
| Наличие патогенных и болезнетворных микроорганизмов, в том числе энтеробактерий (патогенных серовариантов кишечной палочки, сальмонелл, протей), энтерококков, стафилококков, клостридий, КОЕ/см <sup>3</sup> | Не допускается                      | н/о                                          |

Примечание: н/о – не обнаружено.

По результатам исследования качества биопрепарата примеси токсичных элементов (свинца, кадмия, ртути, мышьяка) не выявлены; не обнаружены патогенные и болезнетворные микроорганизмы, в том числе энтеробактерии (патогенные сероварианты кишечной палочки, сальмонеллы, протей), энтерококки, стафилококки, клостридии.

На следующем этапе оценки безопасности разработанного препарата осуществили оценку цитотоксичности. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) указывают, что на выживаемость клеток влияют доза препарата, тип препарата и взаимодействие этих факторов. Штамм *Pseudomonas chlororaphis* отличался по влиянию на клетки от других (визуальные наблюдения за лунками). Каждый повтор эксперимента представлен отдельно. Для всех трёх препаратов концентрация 1 % от объёма культуральной среды оказывает положительное влияние на выживаемость клеток во всех экспериментах.

При 25 % и выше концентрации *Priestia aryabhatai* от объёма культуральной среды выживаемость клеток относительно контроля снижается, для *Bacillus subtilis* при экспозиции 24 часа выживаемость клеток при 25 % концентрации препарата от объёма культуральной среды немного ниже выживаемости контроля; при увеличении концентрации выживаемость также резко снижается. Общий график выживаемости клеток при различных концентрациях препаратов представлен на рисунке 6.3.1.



Примечание: вверху первый и второй повтор эксперимента с малым временем инкубации, внизу – первый и второй повтор эксперимента с большим временем инкубации. Пустые точки – экспериментальные значения, закрашенные точки – средние значения, интервалы – стандартное отклонение.

Рисунок 6.3.1 – Выживаемость клеток НЕК293Т при различных концентрациях образцов *Priestia aryabhatai*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis* в культуральной среде

При экспозиции 48 часов и концентрации *Priestia aryabhatai* и *Bacillus subtilis* 25 % и выше от объёма культуральной среды выживаемость клеток значительно снижается. Для препарата *Pseudomonas chlororaphis*

выживаемость клеток при экспозиции 24 часа снижается до 0 только при полной замене среды на препарат; при экспозиции 48 часов выживаемость клеток при 25 % концентрации препарата от объёма культуральной среды немного ниже выживаемости контроля, при концентрации 50 % от объёма культуральной среды выживаемость падает до 50 %, а при полной замене среды на препарат также снижается до 0. Исследование таких лунок под микроскопом показало крайне слабую жизнедеятельность клеток (изменение морфологии клеток, их отделение от подложки).

Для определения срока годности разработанного опытного биопрепарата для растений зафиксировали изменение титра микроорганизмов в ходе хранения при  $4\pm 2^\circ\text{C}$ . Результаты представлены на рисунке 6.3.2.

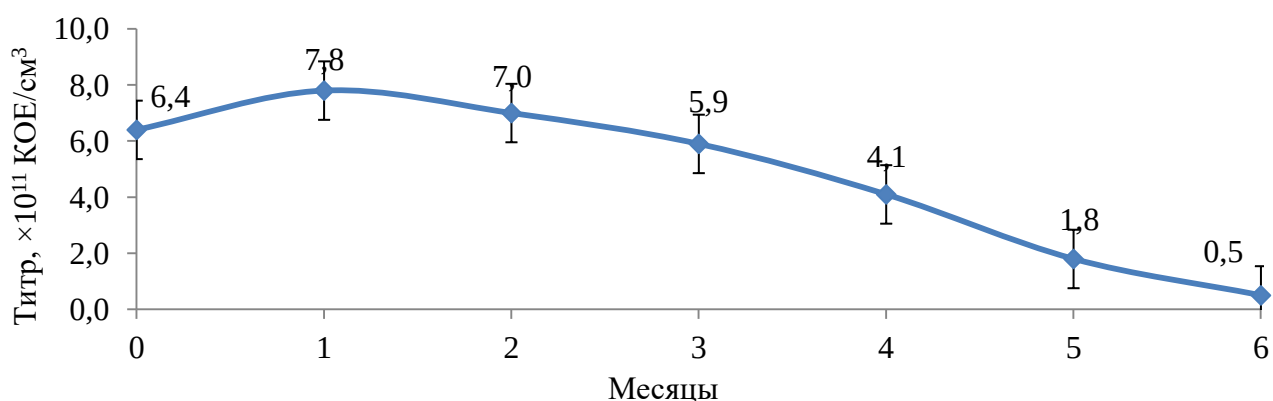


Рисунок 6.3.2 – Определение срока годности разработанного опытного биопрепарата

Исходный титр микроорганизмов в опытном биопрепарате составлял  $6,4 \times 10^{11}$  КОЕ/см<sup>3</sup>. После одного месяца хранения показатель увеличился до максимального значения  $7,8 \times 10^{11}$  КОЕ/см<sup>3</sup>, что на 21,9 % превышало исходный уровень. На втором месяце титр снизился до  $7,0 \times 10^{11}$  КОЕ/см<sup>3</sup>. К третьему месяцу хранения численность жизнеспособных микроорганизмов составила  $5,9 \times 10^{11}$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

В последующий период наблюдалось постепенное снижение титра. К концу шестого месяца титр составлял  $5 \times 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Таким образом, несмотря на выявленную тенденцию к снижению численности

жизнеспособных клеток, в течение всего исследуемого периода титр микроорганизмов сохранялся на уровне  $10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>.

Полученные результаты свидетельствуют о стабильности микробиологического состава препарата в условиях охлажденного хранения и позволяют установить предварительный срок годности опытного биопрепарата не менее 6 месяцев при температуре  $4 \pm 1$  °С.

#### **6.4 Экономическая оценка разработанного биопрепарата**

Основной целевой аудиторией разрабатываемого препарата являются сельскохозяйственные предприятия и агрохолдинги, специализирующиеся на производстве зерновых культур; фермерские и крестьянские хозяйства; семеноводческие предприятия; организации, осуществляющие централизованную предпосевную подготовку и протравливание семенного материала; предприятия, внедряющие элементы биологизации земледелия и технологии снижения зависимости от минеральных удобрений.

Планируемая стоимость продукта (цена для конечного потребителя) определена на текущий момент как усредненная цена существующих аналогов на рынке для целей финансово-инвестиционных расчетов. Структура производственной себестоимости принята на основании укрупненного распределения затрат. Материальные затраты составляют 85 % полной себестоимости, в том числе затраты на сырье – 75 %, транспортные расходы – 2 %, топливно-энергетические расходы – 4 %, затраты на упаковку – 4 %. Затраты на сырье и материалы для производства биопрепарата приведены в таблице 6.4.1.

Таблица 6.4.1 – Затраты на сырье и материалы для производства биопрепарата

| Сырье и материалы       | Расход сырья на 1 дм <sup>3</sup> | Расход сырья на 10 дм <sup>3</sup> | Расчетная закупочная цена, р./кг | Стоимость на 10 дм <sup>3</sup> , р. |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Триптон, г              | 10                                | 100                                | 4 464,08                         | 446,41                               |
| Дрожжевой экстракт, г   | 5                                 | 50                                 | 28 178,00                        | 1 408,90                             |
| Натрий хлористый, г     | 10                                | 100                                | 100,00                           | 10,00                                |
| Меласса, г              | 6                                 | 60                                 | 10,00                            | 0,60                                 |
| Мочевина, г             | 1                                 | 10                                 | 47,00                            | 0,47                                 |
| Вода технологическая, л | 1                                 | 10                                 | –                                | учтена в табл. 6.4.2                 |
| Итого                   |                                   |                                    |                                  | 1 866,38                             |

Доли затрат с отчислениями и амортизационных отчислений составляют по 2 %, условно-постоянных расходов – 11 % (таблица 6.4.2).

Таблица 6.4.2 – Структура себестоимости производства и цены 10 дм<sup>3</sup> биопрепарата

| Статьи затрат                      | Удельный вес, %              | Себестоимость, р. |
|------------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Материальные затраты, в том числе: | 85                           | 2 115,23          |
| Сырье                              | 75                           | 1 866,38          |
| Транспортные расходы               | 2                            | 49,77             |
| Топливо-энергетические расходы     | 4                            | 99,54             |
| Упаковка                           | 4                            | 99,54             |
| Затраты с отчислениями             | 2                            | 49,77             |
| Амортизация                        | 2                            | 49,77             |
| Условно-постоянные расходы         | 11                           | 273,74            |
| Полная себестоимость               | 100                          | 2 488,51          |
| Рентабельность                     | 20 % от полной себестоимости | –                 |
| Прибыль                            | –                            | 497,70            |
| Оптовая цена                       | –                            | 2 986,21          |

Затраты с отчислениями и амортизационные расходы составляют по 2 % полной себестоимости. Условно-постоянные расходы, включающие затраты, связанные с организацией и обеспечением производственного процесса, составляют 11 %. В результате полная себестоимость производства партии биопрепарата объемом 10 дм<sup>3</sup> составляет 2 488,51 р.

При уровне рентабельности 20 % расчетная прибыль составила 497,70 р., а оптовая цена партии – 2 986,21 р. Таким образом, расчетная оптовая стоимость 1 дм<sup>3</sup>

препарата составляет 298,62 р. При установленной норме применения 2 дм<sup>3</sup> на 1 т семян пшеницы затраты на биопрепарат при обработке 1 т семенного материала составляют 597,24 р. Сравнительная экономическая характеристика биопрепарата и химических препаратов для предпосевной обработки пшеницы и микробиологических препаратов-конкурентов приведена в таблицах 6.4.3 и 6.4.4.

Таблица 6.4.3 – Сравнительная экономическая характеристика биопрепарата и химических препаратов для предпосевной обработки пшеницы

| Показатель                                                 | Разработанный биопрепарат                                                                     | Виал Трио                                   | МАКСИМ Форте                                   |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Тип препарата                                              | Бактериальный препарат                                                                        | Химический фунгицидный протравитель         | Химический фунгицидный протравитель            |
| Действующая основа                                         | <i>Priestia aryabhatai</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> ,<br><i>Pseudomonas chlororaphis</i> | Прохлораз,<br>тиабендазол,<br>ципроконазол  | Флудиоксонил,<br>тебуконазол,<br>азоксистробин |
| Основное назначение                                        | Улучшение роста и питания растений;<br>контроль комплекса заболеваний                         | Контроль комплекса грибных заболеваний      | Контроль комплекса грибных заболеваний         |
| Норма расхода, дм <sup>3</sup> /т                          | 2,0                                                                                           | 0,8–1,25                                    | 1,5–1,75                                       |
| Цена 1 дм <sup>3</sup> , р.                                | 298,62                                                                                        | 1644                                        | 3000                                           |
| Стоимость заводской/расчетной партии, р.                   | 2 986,21 за 10 дм <sup>3</sup>                                                                | 8 222 за 5 дм <sup>3</sup>                  | 15 000 за 5 дм <sup>3</sup>                    |
| Стоимость обработки 1 т семян, р.                          | 597,24                                                                                        | 1315–2055                                   | 4500–5250                                      |
| Масса семян, обрабатываемая 5 дм <sup>3</sup> препарата, т | 2,5                                                                                           | 4,0–6,25                                    | 2,86–3,33                                      |
| Характер воздействия                                       | Биологический                                                                                 | Фунгицидный, системный и локально-системный | Контактно-системный фунгицидный                |
| Класс опасности                                            | Подлежит установлению при регистрации                                                         | 3-й класс                                   | 2-й класс                                      |

Анализ сравнительной экономической характеристики разработанного биопрепарата и химических фунгицидных протравителей семян пшеницы показал, что бактериальный препарат характеризуется существенно более низкой стоимостью единицы объема. Цена 1 дм<sup>3</sup> разработанного биопрепарата составляет

298,62 р., тогда как для препарата «Виал Трио» данный показатель равен 1 644 р., а для «МАКСИМ Форте» – 3 000 р. Таким образом, стоимость 1 дм<sup>3</sup> разработанного биопрепарата ниже стоимости 1 дм<sup>3</sup> «Виал Трио» в 5,51 раза, а «МАКСИМ Форте» – в 10,05 раза.

Таблица 6.4.4 – Сравнительный анализ разрабатываемого биопрепарата и микробиологических препаратов-конкурентов

| Показатель                                 | Разработанный биопрепарат                                                                      | Азофит                                     | Экстрасол                                          |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Тип препарата                              | Микробный биопрепарат комплексного действия                                                    | Микробиологическое удобрение, азотфиксатор | Микробиологическое удобрение                       |
| Микробиологическая основа                  | <i>Priestia aryabhattai</i> ,<br><i>Bacillus subtilis</i> ,<br><i>Pseudomonas chlororaphis</i> | <i>Azotobacter vinelandii</i>              | <i>Bacillus subtilis</i> Ч-13                      |
| Количество бактериальных штаммов           | 3                                                                                              | 1                                          | 1                                                  |
| Технологическая особенность                | Совместное культивирование трех штаммов                                                        | Монокультура                               | Монокультура                                       |
| Основная функциональная направленность     | Ростостимулирующее действие, улучшение питания растений, биоконтролирующие свойства            | Улучшение азотного питания растений        | Стимуляция роста и повышение устойчивости растений |
| Применение на зерновых культурах           | Пшеница                                                                                        | Зерновые культуры                          | Зерновые культуры                                  |
| Способ применения                          | Предпосевная обработка семян                                                                   | Предпосевная обработка семян               | Предпосевная обработка семян                       |
| Норма расхода, дм <sup>3</sup> /т семян    | 2,0                                                                                            | 1,0                                        | 1,0                                                |
| Объем сравниваемой партии, дм <sup>3</sup> | 10                                                                                             | 10                                         | 10                                                 |
| Цена 10 дм <sup>3</sup> , р.               | 2 986,21                                                                                       | 3 750                                      | 1 793                                              |
| Цена 1 дм <sup>3</sup> , р.                | 298,62                                                                                         | 375                                        | 179                                                |
| Стоимость обработки 1 т семян, р.          | 597,24                                                                                         | 375                                        | 179                                                |

Несмотря на более высокую норму расхода разработанного биопрепарата, составляющую 2,0 дм<sup>3</sup>/т семян, прямые затраты на обработку 1 т семенного

материала остаются ниже, чем при использовании химических фунгицидных протравителей. Стоимость обработки 1 т семян разработанным биопрепаратом составляет 597,24 р., тогда как для «Виал Трио» она находится в диапазоне 1 315–2 055 р./т, а для «МАКСИМ Форте» – 4 500–5 250 р./т. Следовательно, применение разработанного биопрепарата позволяет снизить прямые затраты на обработку 1 т семян по сравнению с «Виал Трио» на 54,58–70,94 %, а по сравнению с «МАКСИМ Форте» – на 86,73–88,62 %.

Сравнение разработанного биопрепарата с микробиологическими препаратами-конкурентами показало более сложную структуру конкурентных преимуществ. Расчётная цена 10 дм<sup>3</sup> разработанного биопрепарата составляет 2 986,21 р., что на 20,37 % ниже стоимости аналогичного объёма препарата «Азофит» (3 750 р.). Цена 1 дм<sup>3</sup> разработанного препарата также ниже и составляет 298,62 р./дм<sup>3</sup> против 375 р./дм<sup>3</sup> у «Азофита».

В то же время установленная оптимальная норма расхода разработанного биопрепарата составляет 2,0 дм<sup>3</sup>/т семян, тогда как для «Азофита» и «Экстрасола» она равна 1,0 дм<sup>3</sup>/т. Поэтому стоимость обработки 1 т семян разработанным препаратом составляет 597,24 р., что выше, чем при применении «Азофита» (375 р./т) и «Экстрасола» (179 р./т). Тем не менее разработанный биопрепарат обладает рядом функциональных преимуществ, к которым относится трехкомпонентный состав препарата, включающий *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*. В отличие от препаратов «Азофит» и «Экстрасол», которые основаны на монокультурах, разработанный препарат представляет собой консорциум микроорганизмов, что потенциально обеспечивает более широкий спектр биологического действия.

Таким образом, экономический анализ показал, что разработанный биопрепарат наиболее выгодно позиционируется при сравнении с химическими фунгицидными протравителями, поскольку обеспечивает существенно более низкие прямые затраты на обработку 1 т семян пшеницы.

Для дальнейшей практической реализации разработанного биопрепарата необходима его государственная регистрация. Согласно методическим указаниям по

регистрационным испытаниям пестицидов в части биологической эффективности. Общая часть (утв. Научно-техническим советом (секция земледелия и растениеводства) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (протокол от 8 мая 2024 г. N 12)) стандартный вариант испытаний включает: одна культура, три нормы расхода, три почвенно-климатические зоны и два вегетационных сезона. Согласно данным калькулятора федеральной регистрационной палаты химических и биологических средств осуществлен расчет стоимости регистрации разработанного биофунгицида. Параметры расчета представлены в таблице 6.4.5.

Таблица 6.4.5 – Параметры расчета стоимости государственной регистрации биопрепарата

| Параметр калькулятора          | Выбранное значение     |
|--------------------------------|------------------------|
| Раздел                         | Полная регистрация     |
| Назначение                     | Биологический пестицид |
| Количество культур             | 1                      |
| Количество действующих веществ | 3                      |

Согласно расчету, выполненному с использованием калькулятора Федеральной регистрационной палаты химических и биологических средств, ориентировочная стоимость комплекса регистрационных испытаний микробного препарата на одной полевой культуре составляет 5 509,35 тыс. руб. без НДС (таблица 6.4.6).

Таблица 6.4.6 – Стоимость государственной регистрации биопрепарата

| Вариант расчета                                            | Выбранное значение  |
|------------------------------------------------------------|---------------------|
| Базовый расчет, тыс. руб.                                  | 5 509,35            |
| Базовый расчет с учетом государственной пошлины, тыс. руб. | 5 514,35            |
| С доплатой за класс опасности, тыс. руб.                   | 6 014 350–8 014 350 |

С учетом государственной пошлины общие базовые затраты оцениваются в 5 514,35 тыс. руб. В зависимости от класса опасности препарата фактические расходы могут составить 6 014,35–8 014,35 тыс. руб. без НДС.

Для дальнейшей коммерциализации разработанного биопрепарата получены патенты на изобретения № 2850674 и 2861018 (Приложение В). Разработаны и утверждены технические условия и технологическая инструкция по производству (ТУ 20.20.19-319-02068309-2026 и ТИ ТУ 20.20.19-319-02068309-2026, приложение Г).

## 6.5 Заключение по главе 6

Подобраны параметры получения биопрепарата на основе консорциума ростостимулирующих PGP-бактерий (*Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis*), обеспечивающие максимальное накопление биомассы и показатели активности биопрепарата: время культивирования: 22–24 ч; температура культивирования: 28–30 °С; состав питательной среды, г/дм<sup>3</sup>: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; натрий хлористый – 10; меласса – 6; мочевины – 1.

В лабораторных условиях установлено положительное влияние биопрепарата на показатели роста и развития пшеницы сорта Экстра, включая увеличение всхожести (до 78 %), энергии прорастания (до 33 %) и содержания хлорофилла. Максимальная эффективность в большинстве параметров отмечена при исследуемой концентрации биопрепарата, равной 2 дм<sup>3</sup>/т. Концентрация биопрепарата, равная 1 дм<sup>3</sup>/т, также показала значительное улучшение ростовых характеристик.

Изучены показатели качества и безопасности разработанного биопрепарата, в частности: количество жизнеспособных клеток; массовая концентрация примесей токсичных элементов (свинца, кадмия, ртути, мышьяка); наличие патогенных и болезнетворных микроорганизмов, в том числе энтеробактерий (патогенных серовариантов кишечной палочки, сальмонелл, протей), энтерококков, стафилококков, клостридий.

Для культуральной жидкости 3 бактериальных штаммов (*Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas chlororaphis*) на культуре нормальных клеток человека НЕК293Т выполнен МТТ-тест, который показал отсутствие у них цитотоксичности при концентрации 1 % от объёма культуральной среды.

Изучен срок хранения разработанного биопрепарата. Полученные результаты свидетельствуют о стабильности микробиологического состава препарата не менее 6 месяцев при температуре  $4 \pm 1$  °С.

Проведенный расчет показал, что полная себестоимость производства  $10 \text{ дм}^3$  разработанного биопрепарата составляет 2 488,51 руб., а расчетная оптовая цена при рентабельности 20 % – 2 986,21 руб. Стоимость  $1 \text{ дм}^3$  препарата составляет 298,62 руб., а затраты на обработку 1 т семян пшеницы при норме применения  $2 \text{ дм}^3/\text{т}$  – 597,24 руб.

Таким образом, предложенная технология производства характеризуется относительно невысокими расчетными затратами и может рассматриваться как экономически перспективная для внедрения в сельскохозяйственное производство, в том числе на предприятиях, ориентированных на биологизацию земледелия и снижение зависимости от традиционных агрохимических средств.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Осуществлен скрининг 15 штаммов на наличие биотехнологически ценных свойств, в частности: способность к накоплению общего азота, продуцированию аммиака, фитогормонов, сидерофоров, АЦК-деаминазы солюбилизации фосфатов и цинка, образованию биопленок, а также антагонистической активности в отношении фитопатогенов. По результатам ранжирования ростостимулирующих и антагонистических показателей отобраны восемь перспективных штаммов: *Ensifer mexicanus* B-4064; *Ensifer meliloti* B-219; *Rhizobium tropici* B-216; *Mesorhizobium mediterraneum* B-4062; *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-548; *Azospirillum brasilense* B-11094; *Pantoea ananatis* B-5292 и *Azotobacter vinelandii* B-932.

2. Изучена биологическая совместимость 8-ми перспективных штаммов, сконструировано 7 микробных консорциумов; исследованы активности разработанных консорциумов *in vitro*; отобраны 2 перспективных консорциума для лабораторной апробации: консорциум № 4 (*Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 1:1:3 соответственно) и консорциум № 5 (*Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 2:1:1 соответственно). Исследована эффективность влияния перспективных консорциумов на морфометрические показатели яровой мягкой пшеницы сортов «Сибирский Альянс», «Памяти Афродиты», «Надежда Кузбасса» в лабораторных условиях (энергия прорастания, всхожесть, средняя длина ростка, средняя длина корня, сухая масса наземной и подземной части, содержание хлорофилла и каротиноидов, азота в наземной части); отобран 1 перспективный консорциум № 5 (*Ensifer meliloti* B-219, *Ensifer mexicanus* B-4064 и *Rhizobium tropici* B-216 в соотношении 2:1:1 соответственно). Данный консорциум рекомендуется для дальнейшей апробации в условиях полевого севооборота при возделывании яровой мягкой пшеницы. Результаты полевых испытаний позволят обосновать

перспективность масштабирования технологии и производства биопрепарата для применения в агропромышленном комплексе.

3. Проведено полногеномное и транскриптомное исследование трех перспективных бактериальных штаммов. Филогеномный анализ по 120 консервативным белкам позволил уточнить таксономическую принадлежность штаммов и идентифицировать их как *Priestia aryabhatai* (*Ensifer meliloti* B-219), *Bacillus subtilis* (*Ensifer mexicanus* B-4064) и *Pseudomonas chlororaphis* (*Rhizobium tropici* B-216). Установлено, что *Priestia aryabhatai* характеризуется преимущественно косвенными ростостимулирующими механизмами, связанными со стрессоустойчивостью и поддержанием энергетического метаболизма. Для *Bacillus subtilis* выявлено 11 кластеров биосинтеза вторичных метаболитов, включая сурфактин, фенгицин, бациллаен, бациллибактин, субтилозин А и бацилизин. В геноме *Pseudomonas chlororaphis* обнаружено 23 биосинтетических кластера, связанных с продукцией пирролнитрина, феназинов, сидерофоров, липопептидов и цианистого водорода, а также экспрессия генов транспорта железа, цинка и предшественников фитогормонов.

4. Подобраны рациональные параметры культивирования биопрепарата, обеспечивающие накопление микробной биомассы, а также сохранение его функциональной биотехнологической активности: продолжительность культивирования: 22–24 ч, температура: 28–30 °С, питательная среда следующего состава, г/дм<sup>3</sup>: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; натрий хлористый – 10; меласса – 6; мочевины – 1. Проведена оценка безопасности разработанного биопрепарата. МТТ-тест показал отсутствие цитотоксичности штаммов при концентрации культуральной жидкости бактериальных штаммов 1 % от всего объема среды.

5. Оценена экономическая целесообразность производства биопрепарата. Экономический анализ показал, что расчетная оптовая стоимость 1 дм<sup>3</sup> препарата составляет 298,62 р. (затраты на 1 т семян пшеницы – 597,24 р.).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Авдеенков, П. П. Создание условий для денитрификации / П. П. Авдеенков // Апробация. – 2019. – № 4(67). – С. 9–11.
2. Алиев, Т. А. Биохимическая роль микроэлементов в фиксации молекулярного азота / Т. А. Алиев, А. Г. Марданлы, Г. Т. Гусейнов // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2021. – № 2. – С. 35–41.
3. Анализ показателей почвенного микробиома в процессах, связанных с почвообразованием, трансформацией органического вещества и тонкой регуляции вегетационных процессов / Е. Е. Андронов, Е. А. Иванова, Е. В. Першина и др. // Бюллетень почвенного института им. В.В. Докучаева. – 2015. – № 80. – С. 83–94.
4. Антагонистические свойства бактериальных штаммов, выделенных из среднесолённых почв Сырдарьинской области, по отношению к фитопатогенным грибам / М. К. Рахматова, Т. С. Хусанов, Х. Х. Кушиев и др. // Universum: химия и биология. – 2026. – № 2-1(140). – С. 9–17. <https://doi.org/10.32743/UniChem.2026.140.2.21907>.
5. Антифунгальные и фитостимулирующие свойства ризосферного штамма *Bacillus subtilis* Ч-13 □продуцента биопрепаратов / В. К. Чеботарь, Н. М. Макарова, А. И. Шапошников и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45. – № 4. – С. 465–469.
6. Артамонова, М. Н. Антагонистическая активность ассоциативных ризобактерий / М. Н. Артамонова, Н. И. Потатуркина-Нестерова, А. С. Алексеева // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 10-2. – С. 276–279.
7. Аспекты совместного культивирования *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus aryabhatai* для интенсификации синтеза ростостимулирующих веществ / Ю. Р. Серазетдинова, Н. Н. Богачева, Е. Р. Фасхутдинова и др. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2024. – Т. 54. – № 6. – С. 41–48. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2024-6-4>.

8. Астахов, М. М. Биоконтрольные свойства ризобий в отношении вредных организмов: механизмы действия, спектр активности, эффективность (обзор) / М. М. Астахов, Н. С. Томашевич, А. М. Асатурова // Достижения науки и техники АПК. – 2024. – Т. 38. – № 7. – С. 4–21.  
[https://doi.org/10.53859/02352451\\_2024\\_38\\_7\\_4](https://doi.org/10.53859/02352451_2024_38_7_4).
9. Бактериальные штаммы-продуценты хитиназ против фитопатогенных грибов и насекомых-вредителей / К. В. Механцева, А. А. Кудрявцева, Р. В. Скрипниченко и др. // Биотехнология. – 2026. – Т. 42. – № 1. – С. 5–23.  
<https://doi.org/10.56304/S0234275826010060>.
10. Бактерии рода *Pseudomonas* для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения / Т. Ю. Коршунова, Е. В. Кузина, Г. Ф. Рафикова и др. // Экобиотех. – 2020. – Т. 3. – № 1. – С. 18–32.  
<https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-1-18-32>.
11. Башкин, В. Н. Современные проблемы биологизации земледелия / В. Н. Башкин // Жизнь Земли. – 2022. – Т. 44. – № 2. – С. 180–191.
12. Биологический контроль заболеваний злаковых культур с применением бактерий рода *Pantoea* / Ю. Р. Серазетдинова, Д. Е. Колпакова, Е. Е. Бородина и др. // Биосфера. – 2025. – Т. 17. – № 3. – С. 153–174.  
<https://doi.org/10.24855/biosfera.v17i3.1006>.
13. Биопестициды, как инструмент биоконтроля в сельском хозяйстве / И. Э. Памирский, А. Ф. Артеменко, А. М. Асатурова и др. // Технологии безопасности жизнедеятельности. – 2025. – № 9. – С. 15–27.  
<https://doi.org/10.17223/29491665/9/2>.
14. Бойкова, И. В. Биологические особенности штамма *Streptomyces* sp. Vizr-018 и его влияние на заболеваемость и урожайность картофеля в Ставропольском крае / И. В. Бойкова // Экологическая химия. – 2026. – Т. 35. – № 2. – С. 70–81.
15. Веселова, М. А. Летучие вещества бактерий: структура, биосинтез, биологическая активность / М. А. Веселова, В. А. Плюта, И. А. Хмель // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 3. – С. 272–287.  
<https://doi.org/10.1134/S0026365619030169>.

16. Взаимосвязь состава корневых экссудатов и эффективности взаимодействия растений пшеницы с микроорганизмами / А. И. Шапошников, А. А. Белимов, Т. С. Азарова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 3. – С. 260–274. <https://doi.org/10.31857/S0555109923030170>.

17. Вклад симбиотического азота бобовых в плодородие почв центрального Черноземья / Б. Ф. Азаров, П. Г. Акулов, В. Б. Азаров и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2008. – № 9. – С. 9–11.

18. Влияние активности микроорганизмов, выделенных из ризосферы *Hedysarum zundukii*, на рост и развитие растений пшеницы / И. А. Васильев, М. С. Каропова, Ю. А. Маркова, И. С. Петрушин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2025. – Т. 15. – № 1(52). – С. 17–23. <https://doi.org/10.21285/achb.958>.

19. Влияние микробного консорциума на изменение уровня консолидации тяжелых металлов в системе «почва - растение» / Н. И. Воробьев, Я. В. Пухальский, С. И. Лоскутов и др. // Агрохимический вестник. – 2023. – № 4. – С. 47–55. <https://doi.org/10.24412/1029-2551-2023-4-008>.

20. Влияние удобрения и ризоагрина на урожайность и качество зерна яровой пшеницы, потоки азота в системе удобрение-почварастение / А. А. Алферов, А. А. Завалин, А. П. Кожемяков и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2019. – Т. 33. – № 9. – С. 10–15. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2019-10902>.

21. Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* на компоненты про-/антиоксидантной системы растений томатов (*Solanum lycopersicum* L.), инфицированных вирусами картофеля X и Y / С. В. Веселова, А. В. Сорокань, В. Ю. Алексеев и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2025. – Т. 61. – № 6. – С. 583–591. <https://doi.org/10.7868/S3034574X25060051>.

22. Влияние эндофитных бактерий *Bacillus velezensis* m66 на транскрипционную активность генов системы рнк-интерференции при развитии защитных реакций против возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary / А. В. Сорокань, В. Ф. Габдрахманова, И. С. Марданшин и др. //

Физиология растений. – 2024. – Т. 71. – № 4. – С. 409–417.  
<https://doi.org/10.31857/S0015330324040039>.

23. Возможное участие цианобактерий в формировании гормональной системы растений / Г. В. Шевченко, Н. Н. Каравайко, С. Ю. Селиванкина и др. // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – № 2. – С. 170.  
<https://doi.org/10.7868/S0015330314020158>.

24. Выделение штаммов-антагонистов, содержащих белковые факторы подавления роста фитопатогенных грибов *Sclerotinia sclerotiorum* и *Phomopsis helianthi* / Л. В. Маслиенко, Е. Ю. Шипиевская, Н. С. Захарченко и др. // Биотехнология. – 2010. – № 3. – С. 50.

25. Генетические детерминанты антагонистической и ростостимулирующей активности штамма *Pantoea pleuroti* / Ю. Р. Серазетдинова, Н. В. Фотина, А. Е. Тупикин и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2026. – Т. 56. – № 2. – С. 234–246.

26. Ереги́на, С. В. Потенциал использования микроорганизмов рода *Bacillus* в растениеводстве / С. В. Ереги́на, М. М. Кузнецова // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2024. – № 3(77). – С. 19–35.  
<https://doi.org/10.24411/2078-1318-2024-3-19-35>.

27. Ермишин, Р. О. Способы ассимиляции азота растениями / Р. О. Ермишин // Цифровая наука. – 2020. – № 8. – С. 43–46.

28. Ефрюшкина, Е. В. Системно-интегративный подход в управлении инновационным потенциалом российской биотехнологической отрасли / Е. В. Ефрюшкина, М. В. Красностанова // Современные технологии управления. – 2023. – № 4 (104). – С. 10406.

29. Жуйкова, О. А. Биоресурсы овса для использования в селекции на фитоиммунитет к грибным болезням в Кировской области / О. А. Жуйкова, Т. К. Шешегова, Г. А. Баталова // Российская сельскохозяйственная наука. – 2021. – № 4. – С. 23–26. <https://doi.org/10.31857/S2500262721040050>.

30. 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.  
<https://doi.org/10.1134/S0002188119080143>.

31. Изучение метаболитов новых перспективных штаммов бактерий – антагонистов рода *Bacillus* для повышения эффективности биопрепаратов фунгицидного действия на их основе / Н. С. Томашевич, Т. М. Сидорова, В. В. Аллахвердян и др. // Юг России: экология, развитие. – 2023. – Т. 18. – № 2(67). – С. 70–81. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2023-2-70-81>.

32. Интенсификация синтеза сурфактинов штаммом *B. Velezensis*, перспективным биоконтрольным агентом для защиты растений от грибных болезней / А. Е. Козицын, А. М. Асатулова, Т. М. Сидорова и др. // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2022. – № 99. – С. 91–99. <https://doi.org/10.21515/1999-1703-99-91-99>.

33. Использование биопрепаратов – дополнительный источник элементов питания растений / И. А. Тихонович, А. А. Завалин, Г. Г. Благовещенская и др. // Плодородие. – 2011. – № 3(60). – С. 9–13.

34. Иткина, Д. Л. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений / Д. Л. Иткина, А. Д. Сулейманова, М. Р. Шарипова // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 2. – С. 204–214. <https://doi.org/10.31857/S0026365621020063>.

35. Козлова, Е. А. Биологизация систем защиты сельскохозяйственных культур от болезней / Е. А. Козлова // Вестник аграрной науки. – 2022. – № 1(94). – С. 17–22. <https://doi.org/10.17238/issn2587-666X.2022.1.17>.

36. Конъюгаты сидерофоров с антибиотиками: структурное разнообразие и антибактериальная активность / В. В. Чернышов, А. С. Кузовлев, Н. Д. Черепанова и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2022. – Т. 24. – № 4. – С. 314–344. <https://doi.org/10.36488/cmac.2022.4.314-344>.

37. Корневые выделения генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.), отличающихся отзывчивостью на бактеризацию / А. И. Шапошников, Т. С. Азарова, Л. В. Кравченко и др. // Молекулярная и прикладная генетика. – 2013. – Т. 14. – С. 63–68.

38. 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. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-3-14-22>.

39. Кулясов, П.А. Окрашивания усовершенствованным методом по Ганс Кристиану Граму для идентификации живого биологического возбудителя ракового новообразования молочной железы кошки / П. А. Кулясов, К. Э. Халгаева // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 3. – С. 28–34.

40. Курамшина, З. М. Повышение толерантности *Triticum aestivum* L. к солевому стрессу с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* / З. М. Курамшина, Р. М. Хайруллин // Физиология растений. – 2023. – Т. 70. – № 3. – С. 293–300. <https://doi.org/10.31857/S001533032260070X>.

41. Курамшина, З. М. Повышение устойчивости растений к засухе с помощью эндофитных штаммов *Bacillus subtilis* / З. М. Курамшина, Р. М. Хайруллин // Физиология растений. – 2023. – Т. 70. – № 3. – С. 259–268. <https://doi.org/10.31857/S0015330322600760>.

42. Ласточкина, О. В. Механизмы ростстимулирующего и защитного действия эндофитных RGP-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. <https://doi.org/10.31857/S0555109923010038>.

43. Летягина, Е.Н. Развитие биоэкономики в России и за рубежом: технологическое обеспечение, проблемы и перспективы / Е. Н. Летягина, А. В. Виноградова, Ю. А. Гриневич // Фундаментальные исследования. – 2026. – № 4. – С. 37–42.

44. Максимов, С. А. Оценка взаимодействия диазотрофов комплексных мелиораций / С. А. Максимов, Е. Б. Стрельбицкая, И. А. Ремез // Мелиорация и водное хозяйство. – 2025. – № 2. – С. 14–19. <https://doi.org/10.32962/0235-2524-2025-2-14-20>.

45. Мембранные рецепторы цитокинина и их регуляторная роль в реакции растений *Arabidopsis thaliana* на фотоокислительный стресс в условиях водного дефицита / М. Н. Данилова, Н. В. Кудрякова, П. Ю. Воронин и др. // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – № 4. – С. 466. <https://doi.org/10.7868/S001533031404006X>.
46. Механизмы контроля *Pseudomonas fluorescens* корневой гнили ячменя, вызываемой *Fusarium culmorum* / В. Ю. Шахназарова, Д. С. Сырова, М. И. Лебединский и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 5. – С. 494–501. <https://doi.org/10.31857/S0555109923050161>.
47. Механизмы протекторного действия салициловой кислоты на растения пшеницы в условиях кадмиевого стресса / Д. Р. Масленникова, Р. А. Фатхутдинова, М. В. Безрукова и др. // Агрохимия. – 2013. – № 3. – С. 72–79.
48. Механизмы формирования и контроля растениями ризосферной микробиоты: современные представления о взаимодействии в системе растение – микроорганизм / М. С. Мазанко, Е. В. Празднова, Ф. Ф. Амирджанов и др. // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. – 2025. – № 4(228). – С. 132–149. <https://doi.org/10.18522/1026-2237-2025-4-132-149>.
49. Микробная биофортификация злаковых культур: перспективы и текущее развитие / Д. Е. Колпакова, Ю. Р. Серазетдинова, Н. В. Фотина и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2024. – Т. 54. – № 2. – С. 191–211. – DOI 10.21603/2074-9414-2024-2-2500.
50. Микробы-антагонисты против фитопатогенных бактерий и грибов (обзор) / Л. И. Домрачева, С. Г. Скугорева, П. А. Стариков и др. // Теоретическая и прикладная экология. – 2022. – № 2. – С. 6–14. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2022-2-006-014>.
51. Национальные проекты.рф: Технологическое обеспечение биоэкономики. – URL: <https://xn--80aapampemcchfmo7a3c9ehj.xn--p1ai/new-projects/bioekonomika/> (дата обращения: 16.03.2026).

52. Национальные проекты.рф: Технологическое обеспечение продовольственной безопасности. – URL: <https://xn--80aapampemcchfmo7a3c9ehj.xn--p1ai/new-projects/bioekonomika/> (дата обращения: 16.03.2026).

53. Новые устойчивые к гербицидам штаммы микроорганизмов для защиты сельскохозяйственных растений / С. П. Четвериков, Д. В. Четверикова, А. А. Кенджиева и др. // Проблемы агрохимии и экологии. – 2020. – № 4. – С. 35–39. <https://doi.org/10.26178/AE.2020.68.95.006>.

54. Нуштаева, А. В. Влияние биопрепаратов на прорастание семян озимой пшеницы / А. В. Нуштаева, Ю. В. Блинохватова // Сурский вестник. – 2025. – № 2(31). – С. 3–7. – [https://doi.org/10.36461/2619-1202\\_2025\\_02\\_001](https://doi.org/10.36461/2619-1202_2025_02_001).

55. Обмен железа в бактериальной клетке: от физиологического значения к новому классу антимикробных препаратов / А. В. Козлов, А. В. Лямин, А. В. Жестков и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2022. – Т. 24. – № 2. – С. 165–170. <https://doi.org/10.36488/cmac.2022.2.165-170>.

56. Особенности развития уникальной бобоворизобияльной симбиосистемы в условиях металл-индуцированного стресса / Я. В. Пухальский, С. И. Лоскутов, Н. И. Воробьев и др. // Аграрная наука. – 2023. – № 8. – С. 106–114. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-373-8-106-114>.

57. Отбор бактериальных штаммов для борьбы с грибковыми заболеваниями *Triticum* spp. / Ю. Р. Серазетдинова, Н. В. Фотина, Л. К. Асякина и др. // Хранение и переработка зерна. – 2023. – № 4. – С. 98–113. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.4.515>.

58. Оценка устойчивости штаммов клубеньковых бактерий сои к рекомендуемым химическим фунгицидам / Ю. В. Лактионов, Ю. В. Косульников, Д. В. Дудникова и др. // Зерновое хозяйство России. – 2019. – № 1(61). – С. 62–67. <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2019-61-1-62-67>.

59. Павлюшин, В. А. Микробиологическая защита растений в технологиях фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: теория и практика (обзор) / В. А. Павлюшин, И. И. Новикова, И. В. Бойкова // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 3. – С. 421–438. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421rus>.

60. Павлюшин, В. А. Перспективы и возможности микробиологической защиты растений для повышения уровня особой безопасности в агроценозах (обзор) / В. А. Павлюшин, И. И. Новикова, И. В. Бойкова // Защита и карантин растений. – 2022. – № 4. – С. 10–18. [https://doi.org/10.47528/1026-8634\\_2022\\_4\\_10](https://doi.org/10.47528/1026-8634_2022_4_10).
61. Перспективные свойства *Bacillus Thuringiensis* и направления их использования для защиты растений / Р. М. Хайруллин, А. В. Сорокань, В. Ф. Габдрахманова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 4. – С. 337–354. <https://doi.org/10.31857/S0555109923040074>.
62. Перспективы совместного применения *Pseudomonas koreensis* и *Pseudomonas plecoglossicida* для биологического обогащения растений азотом / Ю. Р. Серазетдинова, Н. Н. Богачева, К. В. Карчин и др. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2025. – № 1. – С. 116–129. <https://doi.org/10.36107/spfp.2025.1.573>.
63. Петров, В. Б. Микробиологические препараты – базовый элемент современных интенсивных агротехнологий растениеводства / В. Б. Петров, В. К. Чеботарь // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – № 8. – С. 11–15.
64. Применение грибов-антагонистов для предпосевной обработки семян зерновых культур в борьбе с болезнями / С. Н. Михалева, Л. Н. Ульяненко, Н. И. Будынков и др. // Защита и карантин растений. – 2023. – № 12. – С. 9–12. [https://doi.org/10.47528/1026-8634\\_2023\\_12\\_9](https://doi.org/10.47528/1026-8634_2023_12_9).
65. Потенциал совместного применения цеолита и ростостимулирующих бактерий для улучшения роста пшеницы / Н. Н. Богачева, Ю. Е. Афолина, Ю. Р. Серазетдинова и др. // Техника и технология пищевых производств. – 2025. – Т. 55. – № 3. – С. 509–520.
66. Проворов, Н. А. Повышение эффективности симбиотической фиксации азота растениями: молекулярно-генетические подходы и эволюционные модели / Н. А. Проворов // Физиология растений. – 2013. – Т. 60. – № 1. – С. 31. <https://doi.org/10.7868/S0015330313010053>.
67. Проворов, Н. А. Соотношение мутуализма и антагонизма в микробно-растительных взаимодействиях: концепция плеiotропного

симбиоза / Н. А. Проворов // Микология и фитопатология. – 2019. – Т. 53. – № 2. – С. 67–79. <https://doi.org/10.1134/S0026364819020089>.

68. Продуктивность яровой и озимой пшеницы при использовании гриба арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* в условиях дефицита влаги / А. П. Юрков, Г. В. Степанова, Л. М. Якоби и др. // Кормопроизводство. – 2012. – № 11. – С. 18–20.

69. Рамеев, Т. В. Потенциал штамма *Pseudomonas protegens* DA1.2 для создания микробиологического удобрения / Т. В. Рамеев, Д. В. Четверикова, С. П. Четвериков // Естественные и технические науки. – 2025. – № 11(210). – С. 67–70. <https://doi.org/10.25633/ETN.2025.11.08>.

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

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

72. Сёмин А. Н. Интеграция и адаптация биоэкономики в агропромышленном комплексе России / А. Н. Сёмин, Е. В. Килимник // Агропродовольственная политика России. – 2026. – № 1. – С. 47–54. [https://10.35524/2227-0280\\_2026\\_01\\_47](https://10.35524/2227-0280_2026_01_47)

73. Серазетдинова, Ю. Р. Обзор биотехнологических подходов к биообогащению *Triticum aestivum* L / Ю. Р. Серазетдинова, Л. К. Асякина // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2025. – Т. 13. – № 2. – С. 5–15. <https://doi.org/10.14529/food250201>.

74. Сидорова, Т. М. Ассоциативные бактерии как индукторы устойчивости растений к грибным болезням / Т. М. Сидорова, А. М. Асатурова, В. В. Аллахвердян // Агрохимия. – 2026. – № 1. – С. 106–124. <https://doi.org/10.7868/S3034496426010096>.

75. Сидорова, Т. М. Бактериальные агенты как основа биофунгицидов, эффективных против токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium* (обзор) / Т. М. Сидорова, В. В. Аллахвердян, А. М. Асатунова // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 5. – С. 68–85. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2024-5-68-85>.
76. Сидорова, Т. М. Влияние параметров культивирования бактерий *Pseudomonas* на выработку антигрибных экзометаболитов / Т. М. Сидорова, М. М. Астахов, А. М. Асатунова // Российская сельскохозяйственная наука. – 2025. – № 5. – С. 48–53. <https://doi.org/10.7868/S3034582025050094>.
77. Сидорова, Т. М. Особенности антагонизма бактерий рода *Bacillus* по отношению к токсиногенным грибам *Fusarium* при защите растений от болезни и контаминации микотоксинами (обзор) / Т. М. Сидорова, А. М. Асатунова, В. В. Аллахвердян // Юг России: экология, развитие. – 2021. – Т. 16. – № 4(61). – С. 86–103. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2021-4-86-103>.
78. Сидорова, Т. М. Роль бактерий рода *Pseudomonas* и их метаболитов в биоконтроле фитопатогенных микроорганизмов / Т. М. Сидорова, В. В. Аллахвердян, А. М. Асатунова // Агрохимия. – 2023. – № 5. – С. 83–93. <https://doi.org/10.31857/S0002188123050071>.
79. Слезина, М. П. Перспективы использования антимикробных пептидов в качестве биопестицидов нового поколения / М. П. Слезина, А. Н. Шиян, Т. И. Одинцова // Успехи современной биологии. – 2025. – Т. 145. – № 6. – С. 689–705. <https://doi.org/10.7868/S3034634725060072>.
80. Современное развитие и эффективность биологизации земледелия в России / Х. А. Хусайнов, А. А. Завалин, В. К. Чеботарь и др. // МСХ. – 2025. – № 5. – С. 563–566.
81. Создание стабильной формы ростстимулирующих микробиологических препаратов и их эффективность / Ю. В. Лактионов, Т. А. Попова, О. А. Андреев и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – Т. 46. – № 3. – С. 116–118.

82. Солдатова, Н. Ф. Биобезопасность и рынок: комплексный анализ ниши микробиологических питательных сред в России / Н. Ф. Солдатова, Е. С. Ермолова, А. А. Баданов // Практический маркетинг. – 2026. – № 5. – Р. 42–47. <https://doi.org/10.24412/2071-3762-2026-5347-42-47>.

83. Соловьев, А. В. Азот как один из основных элементов в питании растений / А. В. Соловьев, Ю. В. Сидорова // Вестник Российского государственного аграрного заочного университета. – 2021. – № 39(44). – С. 5–12.

84. Состав корневых экзометаболитов мягкой пшеницы и томата, влияющих на растительно-микробные взаимодействия в ризосфере / Л. В. Кравченко, А. И. Шапошников, Н. М. Макарова и др. // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – № 5. – С. 781–786.

85. Сравнительные характеристики корневых систем и корневой экссудации у синтетического, примитивного и современного сортов пшеницы / А. И. Шапошников, А. И. Моргунов, Б. Акин и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 1. – С. 68–78. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.1.68rus>.

86. Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И. В. Максимов, С. В. Веселова, Т. В. Нужная и др. // Физиология растений. – 2015. – Т. 62. – № 6. – С. 763–775. <https://doi.org/10.7868/S0015330315060111>.

87. Сурфактин: биологическая активность и возможность применения в сельском хозяйстве (обзор) / О. В. Кисиль, В. С. Трефилов, В. С. Садыкова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2023. – Т. 59. – № 1. – С. 3–16. <https://doi.org/10.31857/S0555109923010026>.

88. Сырчина, Н. В. Биоудобрения и агенты биологического контроля на основе ризосферных микроорганизмов / Н. В. Сырчина, Л. В. Пилип, Т. Я. Ашихмина // Поволжский экологический журнал. – 2025. – № 3. – С. 344–364. <https://doi.org/10.35885/1684-7318-2025-3-344-364>.

89. Технологическая трансформация агро-промышленного комплекса России: вызовы и возможности (часть первая) / О. В. Терещенко, Л. В. Кавун,

М. С. Климов и др. // Гуманитарные, социально-экономические и общественные науки. – 2025. – № 5. – С. 242–248. <https://doi.org/10.24412/2220-2404-2025-5-33>.

90. 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. <https://doi.org/10.31857/S0002188124050111>.

91. Тихонович, И. А. Комплексное использование микробных препаратов и удобрений при развитии природоподобных технологий в земледелии / И. А. Тихонович, А. А. Завалин // Вестник Российской академии наук. – 2025. – № 6. – С. 59–66. <https://doi.org/10.7868/S3034520025060073>.

92. Тихонович, И. А. Корневые выделения как важный фактор формирования наномолекулярных структур ризосферы / И. А. Тихонович, Л. В. Кравченко, А. И. Шапошников // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2011. – № 1. – С. 25–27.

93. Тихонович, И. А. Перспективы использования азотфиксирующих и фитостимулирующих микроорганизмов для повышения эффективности агропромышленного комплекса и улучшения агроэкологической ситуации в РФ / И. А. Тихонович, А. А. Завалин // Плодородие. – 2016. – № 5(92). – С. 28–32.

94. Федеральная регистрационная палата химических и биологических средств. – URL: <https://fedregpalata.ru/calculator> (дата обращения 13.04.2026).

95. Федорова, О. А. О возможности применения бактерий *Bacillus thuringiensis* для биологического контроля болезней и вредителей в агроценозе сахарной свеклы / О. А. Федорова, Н. В. Безлер // Сахарная свекла. – 2019. – № 7. – С. 29–31. <https://doi.org/10.25802/SB.2019.95.89.006>.

96. Фосфат-соллюбилизирующая активность ризобактерий пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Г. Х. Кадырова, М. С. Садуллаева, Ш. Ш. Атаджанова и др. // Universum: химия и биология. – 2022. – № 12-1(102). – С. 22–27. <https://doi.org/10.32743/UniChem.2022.102.12.14609>.

97. Чевердин, Ю. И. Роль ассоциативных микроорганизмов в обеспеченности растений ярового ячменя нитратным азотом в условиях ЦЧЗ / Ю. И. Чевердин, А. Ю. Чевердин, М. Ю. Сауткина // Journal of agriculture and environment. – 2023. – № 10(38). <https://doi.org/10.23649/JAE.2023.38.2>.
98. Чернявская, И. В. К вопросу изучения роли бактерий в биогеохимическом круговороте азота в биосфере / И. В. Чернявская, Н. В. Кабаян, О. С. Кабаян // Наука: комплексные проблемы. – 2019. – № 1(13). – С. 165–169.
99. Шешегова, Т. К. Влияние микробной инокуляции семян на биоконтроль корневых гнилей, биометрию растений и урожайность яровой пшеницы / Т. К. Шешегова, Л. М. Щеклеина, П. А. Стариков // Таврический вестник аграрной науки. – 2024. – № 1(37). – С. 187–197. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10930956>.
100. Шишин, М. В. Исследование морфологических и антимикробных свойств микроорганизмов кишечного тракта / М. В. Шишин, А. Ю. Просеков // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – Т. 39. – № 4. – С. 131–137.
101. Штарк, О. Ю. Продуцирование антифунгальных метаболитов *Pseudomonas chlororaphis* при росте на различных источниках питания / О. Ю. Штарк, А. И. Шапошников, Л. В. Кравченко // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – № 5. – С. 645–650.
102. Эндوفитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений (обзор) / В. К. Чеботарь, Н. В. Мальфанова, А. В. Щербаков и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – № 3. – С. 283. <https://doi.org/10.7868/S0555109915030058>.
103. Эффективность бобово-ризобияльного симбиоза нут-бактерии при использовании минеральных удобрений / Ю. В. Лактионов, С. Н. Белоброва, А. П. Кожемяков и др. // Плодородие. – 2013. – № 5(74). – С. 25–26.
104. Эффективность применения биопрепаратов и азотного удобрения на яровой пшенице / Д. Ньямбосе, С. Н. Сапожников, Л. С. Чернова и др. // Плодородие. – 2023. – № 4(133). – С. 82–86. <https://doi.org/10.25680/S19948603.2023.133.20>.

105. 2-Tridecanone impacts surface-associated bacterial behaviours and hinders plant-bacteria interactions / I. M. López-Lara, J. Nogales, A. Pech-Canul et al. // Environmental microbiology. – 2018. – Vol. 20(6). – P. 2049–2065. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14083>.
106. Antagonistic activity of extremophilic bacteria against phytopathogens in agricultural crops / L. K. Asyakina, Yu. R. Serazetdinova, A. S. Frolova et al. // Food Processing: Techniques and Technology. – 2023. – Vol. 53. – №. 3. – P. 565–575.
107. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050 / M. Dijk, T. Morley, M. L. Rau et al. // Nat food. – 2021. – Vol. 2. – P. 494–501. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00322-9>.
108. A Novel Fungicide Consortium: Is It Better for Wheat Production and How Does It Affect the Rhizosphere Microbiome? / L. Asyakina, P. Barsukov, Yu. Serazetdinova et al. // Applied Microbiology. – 2025. – Vol. 5. – №. 4. – P. 142.
109. Abdenaceur, R. Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth / R. Abdenaceur, B. T. Farida, D. Mourad et al. // International microbiology. – 2022. – Vol. 25(4). – P. 817–829. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00263-8>.
110. Adaptive laboratory evolution reveals regulators involved in repressing biofilm development as key players in *Bacillus subtilis* root colonization / M. Pomerleau, V. Charron-Lamoureux, L. Léonard et al. // ASM journals. – 2024. – Vol. 9. – P. e00843-23. <https://doi.org/10.1128/msystems.00843-23>.
111. Ahmed, E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S. J. M. Holmström // Microbial biotechnology. – 2014. – Vol. 7(3). – P. 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>.
112. Aldehyde group driven aggregation-induced enhanced emission in naphthalimides and its application for ultradetection of hydrazine on multiple platforms / N. Meher, S. Panda, S. Kumar et al // Chemical science. – 2018. – Vol. 9 (16). – P. 3978–3985. <https://doi.org/10.1039/c8sc00643a>.

113. Altieri, V. Efficacy of preharvest application of biocontrol agents against gray mold in grapevine / V. Altieri, V. Rossi, G. Fedele // *Frontiers plant pathogen interactions*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1154370. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1154370>.
114. An exopolysaccharide-producing novel *Agrobacterium pusense* strain JAS1 isolated from snake plant enhances plant growth and soil water retention / J. Kaur, G. Mudgal, K. Chand et al. // *Scientific reports*. – 2022. – Vol. 12. – P. 21330. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25225-y>.
115. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two venturia inaequalis strains possessing different tebuconazole sensitivity / H. Desmyttere, C. Deweer, J. Muchembled et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 2327. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>.
116. Assembly of long error-prone reads using repeat graphs / M. Kolmogorov, J. Yuan, Y. Lin et al. // *Nature biotechnology*. – 2019. – Vol. 37. – P. 540–546.
117. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper / Q. T. Phi, Y. M. Park, K. J. Seul et al. // *Journal of microbiology and biotechnology*. – 2010. – Vol. 20(12). – P. 1605–1613.
118. *Bacillus subtilis* TR47II as a source of bioactive lipopeptides against gram-negative pathogens causing nosocomial infections / F. S. Freitas, T. C. A. Lage, B. A. L. Ayupe et al. // *3 Biotech*. – 2020. – Vol. 10(11). – P. 474. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02459-z>.
119. Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives / M. Ayaz, C. H. Li, Q. Ali et al. // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28(18). – P. 6735. <https://doi.org/10.3390/molecules28186735>.
120. Bacterial endophytes from horseradish (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) with antimicrobial efficacy against pathogens / D. Egamberdieva, V. Shurigin, B. Alaylar et al. // *Plant, Soil and Environment*. – 2020. – Vol. 66(7). – P. 309–316. <https://doi.org/10.17221/137/2020-PSE>.
121. 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.  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>.

122. Bases of biocontrol: sequence predicts synthesis and mode of action of agrocin 84, the trojan horse antibiotic that controls crown gall / J. G. Kim, B. K. Park, S. U. Kim et al. // Proceedings of the national academy of sciences. – 2006. – Vol. 103(23). – P. 8846–8851. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602965103>.

123. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review / S. P. Chowdhury, A. Hartmann, X. Gao et al. // Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.

124. Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: improving the efficiency of green agriculture / N. Zhang, Z. Wang, J. Shao et al. // Microbial biotechnology. – 2023. – Vol. 16(12). – P. 2250–2263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>.

125. Biofertilizers enhance soil fertility and crop yields through microbial community modulation / X. Zhang, L. Zhang, J. Liu et al. // Agronomy. – 2025. – Vol. 15. – P. 1572. <https://doi.org/10.3390/agronomy15071572>.

126. Biofertilizers in sustainable agriculture: mechanisms, applications, and future prospects / M. Shahzad, R. Hayat, G. Mujtaba et al. // Discover agriculture. – 2025. – Vol. 3. – P. 224. <https://doi.org/10.1007/s44279-025-00318-0>.

127. Biofilm-forming ability of phytopathogenic bacteria: a review of its involvement in plant stress / M. E. Carezzano, M. F. Paletti Rovey, L. D. R. Cappellari et al. // Plants (Basel). – 2023. – Vol. 12(11). – P. 2207. <https://doi.org/10.3390/plants12112207>.

128. Biofortification of iron in chickpea by plant growth promoting rhizobacteria / S. Khalid, H. Asghar, M. Akhtar et al. // Pakistan journal of botany. – 2015. – Vol. 47. – P. 1191–1194.

129. Biofungicides based on plant extracts: on the road to organic farming / A. J. Cenobio-Galindo, A. D. Hernández-Fuentes, U. González-Lemus et al. // International journal of molecular sciences. – 2024. – Vol. 25(13). – P. 6879. <https://doi.org/10.3390/ijms25136879>.

130. Biological control agents: mechanisms of action, selection, formulation and challenges in agriculture / M. Villavicencio-Vásquez, F. Espinoza-Lozano, L. Espinoza-Lozano et al. // *Frontiers in agronomy*. – 2025. – Vol. 7. – P. 1578915. <https://doi.org/10.3389/fagro.2025.1578915>.

131. Biological control of postharvest diseases: the evolution of new concepts and perspectives / S. Droby, M. Wisniewski, V. Y. Zhimo et al. // *Annual review phytopathology*. – 2025. – Vol. 63. – P. 501–528. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-121823-025820>.

132. Biomineralization of selenium by the selenate-respiring bacterium *Thauera selenatis* / C.S. Butler, C.M. Debieux, E.J. Dridge et al. // *Biochemical society transactions*. – 2012. – Vol. 40(6). – P. 1239–1243. <https://doi.org/10.1042/BST20120087>.

133. Biopesticides and biological control agents: advances, integration, and prospects for sustainable pest management / A. A. Jalloh, S. Pal, O. Uyi et al. // *Frontiers in sustainable food systems*. – 2026. – Vol. 10. – P. 1805083. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2026.1805083>.

134. *Burkholderia gladioli* E39CS3, an endophyte of *Crocus sativus* Linn., induces host resistance against corm-rot caused by *Fusarium oxysporum* / T. Ahmad, A. Bashir, S. Farooq, S. Riyaz-Ul-Hassan // *Journal of applied microbiology*. – 2022. – Vol. 132(1). – P. 495–508. <https://doi.org/10.1111/jam.15190>.

135. BUSCO: Assessing genomic data quality and beyond / M. Manni, M. R. Berkeley, M. Seppey, E. M. Zdobnov // *Current protocols*. – 2021. – Vol. 1. – P. e323. <https://doi.org/10.1002/cpz1.323>.

136. C15-bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 4-9-2 suppress *Fusarium graminearum* infection and mycotoxin biosynthesis / Z. Liu, Y. Luo, R. Lin et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2025. – Vol. 16. – P. 1599452. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1599452>.

137. Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of <sup>31</sup>P NMR spectroscopy and enzyme addition assays / K. A. Jarosch, A. L. Doolette, R. J. Smernik et al. // *Soil biology and biochemistry*. – 2015. – Vol. 91. – P. 298–309. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.010>.

138. Characterization by high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron ore by a fungus / E.J. Parks, G.J. Olson, F.E. Brinckman et al. // Journal of industrial microbiology. – 1990. – Vol. 5(2–3). – P. 183–189. <https://doi.org/10.1007/BF01573868>.

139. Characterization of lipopeptides biosurfactants produced by a newly isolated strain *Bacillus subtilis* ZNI5: potential environmental application / I. Mnif, H. Rajhi, A. Bouallegue et al. // Journal of polymers and the environment. – 2022. – Vol. 30. – P. 2378–2391. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02361-6>.

140. Classification, application, multifarious activities and production improvement of lipopeptides produced by *Bacillus* / Z. Wang, C. Liu, Y. Shi et al. // Critical reviews in food science and nutrition. – 2024. – Vol. 64(21). – P. 7451–7464. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2185588>.

141. Classifying the metal dependence of uncharacterized nitrogenases / S. E. McGlynn, E. S. Boyd, J. W. Peters et al. // Frontiers in microbiology. – 2013. – Vol. 3. – P. 419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.0041>.

142. Co-Inoculation of *Bacillus* spp. for growth promotion and iron fortification in sorghum / M. Manasa, P. Ravinder, S. Gopalakrishnan et al. // Sustainability. – 2021. – Vol. 13. – P. 12091. <https://doi.org/10.3390/su132112091>.

143. Combining *Bacillus* and *Trichoderma* in bio-organic fertilizers with reduced chemical fertilizer: an effective strategy against cucumber *Fusarium* wilt / X. Luo, J. Ouyang, J. Li et al. // Plants. – 2026. – Vol. 15. – P. 782. <https://doi.org/10.3390/plants15050782>.

144. Community-forming traits play role in effective colonization of plant-growth-promoting bacteria and improved plant growth / D. Pathak, A. Suman, P. Sharma et al. // Frontiers plant symbiotic interactions. – 2024. – Vol. 15. – P. 1332745. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1332745>.

145. Comprehensive genomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* isolates associated with fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) from diverse agroclimatic regions of India / M. Khairnar, S. S. Alhewairini, S. C. Kajale et al. //

Chemical and biological technologies in agriculture. – 2025. – Vol. 12. – P. 135.  
<https://doi.org/10.1186/s40538-025-00811-0>.

146. Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of *Pseudomonas* strains against *Phytophthora infestans* / A. Anand, D. Chinchilla, C. Tan et al. // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1144.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081144>.

147. Das, S. Microbial assay of N<sub>2</sub> fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay / S. Das, T.K. De // *MethodsX*. – 2018. – Vol. 5. – P. 909–914.  
<https://doi.org/10.1016%2Fj.mex.2017.11.010>.

148. Della Mónica, I. F. *In vivo* modulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis and soil quality by fungal P solubilizers / I. F. Della Mónica, A. M. Godeas, J. M. Scervino // *Microbial ecology*. – 2020. – Vol. 79(1). – P. 21–29.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-019-01396-6>.

149. Denning, G. Sustainable intensification of agriculture: the foundation for universal food security / G. Denning // *Npj sustainable agriculture*. – 2025. – Vol. 3. – P. 7. <https://doi.org/10.1038/s44264-025-00047-3>.

150. Development of the circular bioeconomy: drivers and indicators / M. Kardung, K. Cingiz, O. Costenoble et al. // *Sustainability*. – 2021. – Vol. 13. – P. 413. <https://doi.org/10.3390/su13010413>.

151. Díaz-Valle, A. Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by Inoculation with *Rhizobium etli* / A. Díaz-Valle, A. C. López-Calleja, R. Alvarez-Venegas // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1317.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01317>.

152. Dimethyl disulfide exerts antifungal activity against *Sclerotinia minor* by damaging its membrane and induces systemic resistance in host plants / S. Tyagi, K. J. Lee, P. Shukla et al. // *Nature*. – 2020. – Vol. 10. – P. 6547.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-63382-0>.

153. Dimethylpolysulfides production as the major mechanism behind wheat fungal pathogen biocontrol, by *Arthrobacter* and *Microbacterium actinomycetes* /

A. Ballot, J. Dore, M. Rey et al. // Environmental microbiology. – 2023. – Vol. 11. – P. e05292-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05292-22>.

154. Ding, N. Bacterial cyclic lipopeptides as triggers of plant immunity and systemic resistance against pathogens / N. Ding, H. Dong, M. Ongena // Plants. – 2025. – Vol. 14. – P. 2644. <https://doi.org/10.3390/plants14172644>.

155. Dolatabad, H. K. Multifactorial formulation for stable encapsulated plant growth promoting microorganisms / H. K. Dolatabad // Scientific reports. – 2026. – Vol. 16. – P. 4797. <https://doi.org/10.1038/s41598-026-35331-w>.

156. Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach / A. Ullah, M. Nisar, H. Ali et al. // Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – Vol. 103. – P. 7385–7397. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10045-4>.

157. Drought-tolerant rhizobacterial consortia enhance grapevine growth and tolerance to water deficit / G. Canavera, G. Bellotti, H. Tiwari et al. // Frontiers in plant science. – 2026. – Vol. 17. – P. 1735733. <https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1735733>.

158. Dual functionality of pathogenesis-related proteins: defensive role in plants versus immunosuppressive role in pathogens / Z. Han, R. Schneider // Frontiers in plant science. – 2024. – Vol. 15. – P. 1368467. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1368467>.

159. Dual-uptake mode of the antibiotic phazolicin prevents resistance acquisition by gram-negative bacteria / D. Y. Travin, R. Jouan, A. Vigouroux et al. // Molecular and cellular biology. – 2023. – Vol. 14. – P. e00217-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00217-23>.

160. Ebrahimi-Zarandi, M. Actinobacteria as effective biocontrol agents against plant pathogens, an overview on their role in eliciting plant defense / M. Ebrahimi-Zarandi, R. Saberi Riseh, M. T. Tarkka // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – P. 1739. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091739>.

161. Ecophysiology and application of acidophilic sulfur-reducing microorganisms / A. P. Florentino, J. Weijma, A. J. M. Stams et al. // Biotechnology of extremophiles. – 2016. – P. 141–175. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13521-2_5).

162. Ectomycorrhiza formation and willow growth promotion as affected by associated bacteria: role of microbial metabolites and use of C sources / K. Hryniewicz,

A. Ciesielska, I. Haug et al. // Biology and fertility of soils. – 2010. – Vol. 46(2). – P. 139–150. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0419-2>.

163. Effect of *Rhizobium* mechanisms in improving tolerance to saline stress in lettuce plants / M. Ayuso-Calles, J. D. Flores-Félix, F. Amaro et al. // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. – 2023. – Vol. 10. – P. 89. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00463-y>.

164. Effect of Zn solubilizing bacteria on growth promotion and Zn nutrition of rice / S. K. Vaid, B. Kumar, A. Sharma et al. // Journal of soil science and plant nutrition. – 2014. – Vol. 14(4). – P. 889–910. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000071>.

165. Effects of volatile organic compounds on biofilms and swimming motility of *Agrobacterium tumefaciens* / D. E. Sidorova, M. I. Skripka, I. A. Khmel et al. // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – P. 1512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081512>.

166. Endophytic bacteria isolated from *Phaseolus vulgaris* produce phytases with potential for biotechnology application / L. E. D. O. Costa, T. L. R. Corrêa, J. A. Teixeira et al. // Brazilian journal of biological sciences. – 2018. – Vol. 5(11). – P. 657–671. <https://doi.org/10.21472/bjbs.051105>.

167. Enhancement in plant growth and Zinc biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Bacillus altitudinis* / P. Kushwaha, R. Srivastava, K. Pandiyan et al. // Journal of soil science and plant nutrition. – 2021. – Vol. 21(2). – P. 922–935. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00411-5>.

168. Enhancement of wheat growth by plant growth-stimulating bacteria during phytopathogenic inhibition / N. V. Fotina, Yu. R. Serazetdinova, D. E. Kolpakova et al. // Biocatalysis and agricultural biotechnology. – 2024. – Vol. 60. – P. 103294. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103294>.

169. *Ensifer meliloti* strains: as multi-trait bioinoculants enhancing *Cicer arietinum* growth and sustainability / S. Bhatt, J. Kaur, D. Goswami et al. // Vegetos. – 2026. <https://doi.org/10.1007/s42535-026-01654-2>.

170. Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions / L. K. Asyakina, E. E. Vorob'eva, L. A. Proskuryakova et al. // Foods and raw materials. – 2023. – Vol. 11. – №. 1. – P. 162–171. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-556>.
171. Evaluation of chemical and biological products for control of crown gall on rose / C. Oksel, P. Liyanapathirana, M. Parajuli et al. // Pathogens. – 2024. – Vol. 13. – P. 708. <https://doi.org/10.3390/pathogens13080708>.
172. Exploring plant growth promoting traits and biocontrol potential of new isolated *Bacillus subtilis* BS-2301 strain in suppressing *Sclerotinia sclerotiorum* through various mechanisms / M. Ayaz, Q. Ali, W. Zhao et al. // Frontiers in plant science. – 2024. – Vol. 15. – P. 1444328. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1444328>.
173. Fadiji, A. E. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects / A. E. Fadiji, O. O. Babalola // Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2020. – Vol. 8. – P. 467. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>.
174. Fenta, L. Microbial biofungicides as a substitute for chemical fungicides in the control of phytopathogens: current perspectives and research directions / L. Fenta, H. Mekonnen // Scientifica (Cairo). – 2024. – Vol. 2024. – P. 5322696. <https://doi.org/10.1155/2024/5322696>.
175. Filtlong v0.2.1. – URL: <https://github.com/rrwick/Filtlong> (дата обращения 16.02.2026).
176. From soil to health: advancing regenerative agriculture for improved food quality and nutrition security / C. L. Rosier, A. Knecht, J. S. Steinmetz et al. // Frontiers in nutrition. – 2025. – Vol. 12. – P. 1638507. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1638507>.
177. Fungal formation of selenium and tellurium nanoparticles / X. Liang, M. A. M. Perez, K. C. Nwoko et al. // Appl microbiol biotechnol. – 2019. – Vol. 103(17). – P. 7241–7259. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09995-6>.
178. Fungal membrane determinants affecting sensitivity to antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus* spp. / C. Bakker, H. R. Graham,

I. Popescu et al. // Fungal Biology. – 2024. – Vol. 128(7). – P. 2080–2088.  
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.08.006>.

179. Gaiand, S. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat / S. Gaiand // Microbiological research. – 2016. – Vol. 193. – P. 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.005>.

180. Gao, Y. Greenhouse gas emissions from nitrogen fertilizers could be reduced by up to one-fifth of current levels by 2050 with combined interventions / Y. Gao, A. C. Serrenho // Nature food. – 2023. – Vol. 4. – P. 170–178.  
<https://doi.org/10.1038/s43016-023-00698-w>.

181. Genomically-selected antifungal Bacillaceae strains improve wheat yield and baking quality / A. Casal, F. O. Gizzi, S. A. Figueroa et al. // Applied microbiology and biotechnology. – 2025. – Vol. 109. – P. 164.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-025-13544-9>.

182. Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways / S. Lòpez-Fernàndez, S. Compant, U. Vrhovsek et al. // Plant soil. – 2016. – Vol. 405. – P. 155–175.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-015-2631-1>.

183. Grafting improves growth and nitrogen-use efficiency by enhancing NO<sub>3</sub>– uptake, photosynthesis, and gene expression of nitrate transporters and nitrogen metabolizing enzymes in watermelon under reduced nitrogen application / X. Chen, P. Guo, Z. Wang et al. // Plant soil. – 2022. – Vol. 480. – P. 305–327.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-022-05583-2>.

184. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore / M.C. Mastropasqua, M. D’Orazio, M. Cerasiet al. // Molecular microbiology. – 2017. – Vol. 106(4). – P. 543–561. <https://doi.org/10.1111/mmi.13834>.

185. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database / P. A. Chaumeil, A. J. Mussig, P. Hugenholtz et al. // Bioinformatics. – 2019. – Vol. 36. – P. 1925–1927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>.

186. Gupta, S. Decoding the plant growth promotion and antagonistic potential of bacterial endophytes from *Ocimum sanctum* Linn. against root rot pathogen *Fusarium oxysporum* in *Pisum sativum* / S. Gupta, S. Pandey, S. Sharma // Frontiers in plant science. – 2022. – P. 13. – P. 813686. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.813686>.

187. Harnessing the biocontrol potential of *Bradyrhizobium japonicum* FCBP-SB-406 to manage charcoal rot of soybean with increased yield response for the development of sustainable agriculture / U. Khalid, A. Zill-e-Huma, T. Anjum et al. // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12. – P. 304. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020304>.

188. Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol production in the genus *Chromobacterium* / E. T. Johnson, M. J. Bowman, R. P. Gomes et al. // Scientific reports. – 2023. – Vol. 13. – P. 14292. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41277-0>.

189. Identification of a *Sinorhizobium meliloti* YbgC-like thioesterase that contributes to the production of the infochemical 2-tridecanone / L. M. Bernabéu-Roda, G. Rivera-Hernández, V. Cuéllar et al. // Biochemical journal. – 2025. – Vol. 482(19). – P. 1375–1391. <https://doi.org/10.1042/BCJ20253120>.

190. Identification of heterotrophic zinc mobilization processes among bacterial strains isolated from wheat rhizosphere (*Triticum aestivum* L.) / B. Costerousse, L. Schönholzer-Mauclaire, E. Frossard et al. // Appl environ microbiol. – 2018. – Vol. 84(1). – P. e01715–01732. <https://doi.org/10.1128/AEM.01715-17>.

191. Impact of bacterial and fungal inoculants on the resident rhizosphere microbiome and the volatilome of tomato plants under leaf herbivory stress / A. S. Lee Díaz, Z. Minchev, J. M. Raaijmakers et al. // FEMS microbiology ecology. – 2024. – Vol. 100(2). – P. fiad160. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad160>.

192. Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants / F. J. Romera, M. J. García, C. Lucena et al. // Frontiers in plant science. – 2019. – Vol. 10. – P. 287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>.

193. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria / M. Elbadry, R. M. Taha, K. A. EldougDoug et al. // Journal

of plant diseases and protection. – 2006. – Vol. 113. – P. 247–251.  
<https://doi.org/10.1007/BF03356189>.

194. Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* / A. F. El-Rahman, H. A. Shaheen, R. M. El-Aziz et al. // Egyptian journal of biological pest control. – 2019. – Vol. 29. – P. 41. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0143-7>.

195. Integration of molecular tools in microbial phosphate solubilization research in agriculture perspective / B. Alaylar, D. Egamberdieva, M. Gulluce, et al. // World journal of microbiology and biotechnology. – 2020. – Vol. 36(7). – P. 93. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02870-x>.

196. Isolation and characterization of a mycosubtilin homologue antagonizing *Verticillium dahliae* produced by *Bacillus subtilis* strain Z15 / R. Lin, Q. Zhang, L. Yin et al. // PLoS One. – 2022. – Vol. 17(6). – P. e0269861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269861>.

197. Isolation and characterization of potential Zn solubilizing bacteria from soil and its effects on soil Zn release rates, soil available Zn and plant Zn content / R. Dinesh, V. Srinivasan, S. Hamza et al. // Geoderma. – 2018. – Vol. 321. – P. 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.02.013>.

198. Kaspar, F. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review / F. Kaspar, P. Neubauer, M. Gimpel // Journal of natural products. – 2019. – Vol. 82(7). – P. 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>.

199. Kerr, A. Biocontrol of crown gall by *Rhizobium rhizogenes*: challenges in biopesticide commercialisation / A. Kerr, G. Bullard // Agronomy. – 2020. – Vol. 10. – P. 1126. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081126>.

200. Kriesch, L. A global patent dataset of bioeconomy-related inventions / L. Kriesch, S. Losacker // Scientific data. – 2024. – Vol. 11. – P. 1308. <https://doi.org/10.1038/s41597-024-04163-6>.

201. Kucey, R. M. N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of p and micronutrients from soil by wheat / R. M. N. Kucey // Canadian journal of soil science. – 1988. – Vol. 68(2). – P. 261–270. <https://doi.org/10.4141/cjss88-026>.

202. Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review / A. Gupta, U. B. Singh, P. K. Sahu et al. // International journal of environmental research and public health. – 2022. – Vol. 19(5). – P. 3141. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053141>.
203. Lowman DW, Chakraborty R. Characterization of 'Schizokinen'; a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917 / E. P. Storey, R. Boghazian, J. L. Little et al. // Biometals. – 2006. – Vol. 19(6). – P. 637–649. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9001-7>.
204. Lugtenberg, B. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria / B. Lugtenberg, F. Kamilova // Annual review microbiology. – 2009. – Vol. 63. – P. 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>.
205. Madjar, R. M. Nutrient water pollution from unsustainable patterns of agricultural systems, effects and measures of integrated farming / R. M. Madjar, V. G. Scăețeanu, M. A. Sandu // Water. – 2024. – Vol. 16. – P. 3146. <https://doi.org/10.3390/w16213146>.
206. Marcel, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads / M. Marcel // EMBnet journal. – 2011. – Vol. 17(1). – P. 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
207. McCouch, S. Diversifying selection in plant breeding / S. McCouch // PLoS biology. – 2004. – Vol. 2(10). – P. e347. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020347>.
208. Mechanisms and impact of rhizosphere microbial metabolites on crop health, traits, functional components: a comprehensive review / Q. Chen, Y. Song, Y. An et al. // Molecules. – 2024. – Vol. 29(24). – P. 5922. <https://doi.org/10.3390/molecules29245922>.
209. Medaka v1.7.2. – URL: <https://github.com/nanoporetech/medaka> (дата обращения 18.02.2026).
210. Menegat, S. Greenhouse gas emissions from global production and use of nitrogen synthetic fertilisers in agriculture / S. Menegat, A. Ledo, R. Tirado // Scientific reports. – 2022. – Vol. 12. – P. 14490. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18773-w>.

211. Microbes: a potential tool for selenium biofortification / D. Yang, C. Hu, X. Wang et al. // Metallomics. – 2021. – Vol. 13(10). – P. mfab054. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfab054>.
212. Microbial biocontrol in agriculture: from mechanistic understanding to field application / H. T. Nguyen, T. T. Pham, P. T. Nguyen et al. // Discover plants. – 2025. – Vol. 2. – P. 334. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00421-y>.
213. Microbial biofortification of Iron in *Solanum tuberosum* L. through siderophore-producing rhizobacteria along with L-Tryptophan and iron sulphate supply / Z. Mushtaq, M. Liaquat, S. Jehan et al. // Potato res. – 2024. – P. 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11540-024-09785-2>.
214. Microbial inoculants modulate the rhizosphere microbiome, alleviate plant stress responses, and enhance maize growth at field scale / D. Francioli, I.D. Kampouris, T. Kuhl-Nagel et al. // Genome Biology. – 2025. – Vol. 26. – P. 148 <https://doi.org/10.1186/s13059-025-03621-7>.
215. Microbial inoculants with higher capacity to colonize soils improved wheat drought tolerance / J. Li, J. Wang, H. Liu et al. // Microbial biotechnology. – 2023. – Vol. 16. – P. 2131–2144. Available from: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14350>.
216. Microbially enhanced biofertilizers: technologies, mechanisms of action, and agricultural applications / S. Figiel, P. Rusek, U. Ryszko et al. // Agronomy. – 2025. – Vol. 15. – P. 1191. <https://doi.org/10.3390/agronomy15051191>.
217. Mishra, J. 2,4-Diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* JM-1 for management of ear rot disease caused by *Fusarium moniliforme* in *Zea mays* L. / J. Mishra, I. Mishra, N. K. Arora // 3 Biotech. – 2022. – Vol. 12(6). – P. 138. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03201-7>.
218. Morozov, D. V. Scientific-industrial cluster opportunities to implement import substitution programs for biotechnology enterprises / D. V. Morozov // Russian journal of social sciences and humanities. – 2021. – Vol. 15(4). – P. 205–213. <https://doi.org/10.17238/issn1998-5320.2021.15.4.22>.

219. Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects / X. Liu, B. Hu, C. Chu et al. // Journal of genetics and genomics. – 2022. – Vol. 49(5). – P. 394–404.

220. Novel bacterial selenite reductase CsrF responsible for Se(IV) and Cr(VI) reduction that produces nanoparticles in *Alishewanella* sp. WH16-1 / X. Xia, S. Wu, N. Li et al. // Journal of hazardous materials. – 2018. – Vol. 342. – P. 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.051>.

221. Novel oxidized derivatives of antifungal pyrrolnitrin from the bacterium *Burkholderia cepacia* K87 / M. Sultan, K. Park, S. Lee et al. // The journal of antibiotics. – 2008. – Vol. 61. – P. 420–425. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.58>.

222. Oldroyd, G.E.D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants / G.E.D. Oldroyd // Nature reviews microbiology. – 2013. – Vol. 11(4). – P. 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>.

223. Overview of biofertilizers in crop production and stress management for sustainable agriculture / P. Chaudhary, S. Singh, A. Chaudhary et al. // Frontiers in plant science. – 2022. – Vol. 13. – P. 930340. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.930340>.

224. Pandey, P. K. Inside the plant: addressing bacterial endophytes in biotic stress alleviation / P. K. Pandey, R. Samanta, R. N. S. Yadav // Archives of microbiology. – 2019. – Vol. 201. – P. 415–429. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01642-y>.

225. Park, K-H. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities / K.-H. Park, C.-Y. Lee, H.-J. Son // Letters in applied microbiology. – 2009. – Vol. 49(2). – P. 222–228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x>.

226. Pellegrino, E. Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: biofertilization and biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi / E. Pellegrino, S. Bedini // Soil biology and biochemistry. – 2014. – Vol. 68. – P. 429–439. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.030>.

227. Pesticides have negative effects on non-target organisms / N. F. Wan, L. Fu, M. Dainese et al. // Nature communications. – 2025. – Vol. 16. – P. 1360. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-56732-x>.

228. Phenazine-1-Carboxamide regulates pyruvate dehydrogenase of phytopathogenic fungi to control tea leaf spot caused by *Didymella segeticola* / Z. Qi, F. Liu, D. Li et al. // *Phytopathology*. – 2025. – Vol. 115(2). – P. 139–150. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-24-0209-R>.

229. Phenazine-1-Carboxylic Acid (PCA), produced for the first time as an antifungal metabolite by *Truncatella angustata*, a causal agent of grapevine trunk diseases (GTDs) in Iran / A. Cimmino, Z. Bahmani, S. Castaldi et al. // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2021. – Vol. 69 (41). – P. 12143–12147. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03877>.

230. Phytochemical and morpho-physiological response of *Melissa officinalis* L. to different  $\text{NH}_4^{4+}$  to  $\text{NO}_3^{3-}$  ratios under hydroponic cultivation / F. Safaei, A. Alirezalu, P. Noruzi et al. // *BMC plant biology*. – 2024. – Vol. 24. – P. 968. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05693-2>.

231. 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. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0013-y>.

232. Plant defense stimulation by natural isolates of bacillus depends on efficient surfactin production / H. Cawoy, M. Mariutto, G. Henry et al. // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2014. – Vol. 27(2). – P. 87–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>.

233. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities / S. Gopalakrishnan, A. Sathya, R. Vijayabharathi et al. // *3 Biotech* 5. – 2015. – P. 355–377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>.

234. Plant growth-promoting traits in *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* MDSR9 isolated from soybean rhizosphere and itsi on growth and nutrition of soybean and wheat upon inoculation / A. Ramesh, S.K. Sharma, M.P. Sharma et al. // *Agric Res.* – 2014. – Vol. 3(1). – P. 53–66. <https://doi.org/10.1007/s40003-014-0100-3>.

235. Plant growth-promotion and biofortification of chickpea and pigeonpea through inoculation of biocontrol potential bacteria, isolated from organic soils /

S. Gopalakrishnan, S. Vadlamudi, S. Samineni et al. // SpringerPlus. – 2016. – Vol. 5(1). – P. 1882. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3590-6>.

236. Plant root associated bacteria for zinc mobilization in rice / M. Tariq, S. Hameed, K. Malik et al. // Pakistanj of botany. – 2007. – Vol. 39. – P. 245–253.

237. Post translational modifications of Trifolitoxin: a blue fluorescent peptide antibiotic / B. J. Lethbridge, R. E. Asenstorfer, L. S. Bailey et al. // The journal of antibiotics. – 2022. – Vol. 75. – P. 125–135. <https://doi.org/10.1038/s41429-021-00497-0>.

238. Priming of defense-related genes in *Brassica oleracea* var. capitata using concentrated metabolites produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899 / I. R. Santos, D. G. Ribeiro, F. T. P. K. Távora et al. // Brazilian journal of microbiology. – 2022. – Vol. 53(2). – P. 595–604. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00722-4>.

239. 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 et al. // Journal of bioscience and bioengineering. – 2022. – Vol. 1(134). – P. 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.007>.

240. Protective activity of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain 33504-Mat209 against alfalfa mosaic virus infection in faba bean plants / A. Abdelkhalek, S. Bashir, H. El-Gendi et al. // Plants. – 2023. – Vol. 12. – P. 2658. <https://doi.org/10.3390/plants12142658>.

241. *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline / S. Lhospice, N. O. Gomez, L. Ouerdane et al. // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7(1). – P. 17132. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16765-9>.

242. *Pseudomonas syringae* subpopulations cooperate by coordinating flagellar and type III secretion spatiotemporal dynamics to facilitate plant infection / N. López-Pagán, J. S. Rufián, J. Luneau et al. // Nature microbiology. – 2025. – Vol. 10. – P. 958–972. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-01966-0>.

243. Pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol are major contributors to *Pseudomonas protegens* Pf-5 biocontrol against *Botrytis cinerea* in cannabis /

C. Balthazar, R. St-Onge, G. Léger et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 945498. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.945498>.

244. Pyrrolnitrin is integral for antimicrobial activity and phenazine biosynthesis of *Pseudomonas chlororaphis* strains / M. Zameer, I. Shahid, D. N. Baig, et al. // *World journal of microbiology and biotechnology*. – 2025. – Vol. 41. – P. 182. <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04413-8>.

245. Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum* / R. Huang, Z. Feng, X. Chi et al. // *Microbiological research*. – 2018. – Vol. 215. – P. 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.008>.

246. QIAGEN CLC Genomics Workbench Premiu. – URL: <https://clck.ru/3UoeKq> (дата обращения 18.02.2026).

247. Rabbee, M. F. Detection of antagonistic compounds synthesized by *Bacillus velezensis* against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by metabolome and RNA sequencing / M. F. Rabbee, K. H. Baek // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1523. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061523>.

248. Raven v1.8.1. – URL: <https://github.com/lbcb-sci/raven> (дата обращения 18.02.2026).

249. Recent advances in bioinoculant formulations and their shelf-life: a review / S. Monica, S. Panneerselvam, R. Rajasekaran et al. // *Current microbiology*. – 2025. – Vol. 82(11). – P. 506. <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04497-3>.

250. Resistance mechanisms of plant pathogenic fungi to fungicide, environmental impacts of fungicides, and sustainable solutions / T. Islam, N. T. Tamanna, M. N. Matin et al. // *Plants*. – 2024. – Vol. 13. – P. 2737. <https://doi.org/10.3390/plants13192737>.

251. Rethinking microbial biopesticide development and uptake / T. R. Glare, A. Sheppard, M. R. H. Hurst et al. // *World journal of microbiology and biotechnology*. – 2026. – Vol. 42. – P. 314. <https://doi.org/10.1007/s11274-026-05044-3>.

252. Rhizobial volatiles: potential new players in the complex interkingdom signaling with legumes / M. J. Soto, I. M. López-Lara, O. Geiger et al. // *Frontiers in plant science*. – 2021. – Vol. 12. – P. 698912. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.698912>.

253. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin / M. J. Dilworth, K. C. Carson, R. G. F. Giles et al. // *Microbiology (Reading)*. – 1998. – Vol. 144(3). – P. 781–791. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-3-781>. PMID: 33757232.

254. Rhizospheric *Bacillus amyloliquefaciens* protects *Capsicum annuum* cv. geumsugansan from multiple abiotic stresses via multifarious plant growth-promoting attributes / E. A. Kazerooni, S. S. N. Maharachchikumbura, A. Adhikari et al. // *Frontiers in plant science*. – 2021. – Vol. 12. – P. 669693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.669693>.

255. Richardson, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants / A.E. Richardson // *Functional plant biology*. – 2001. – Vol. 28(9). – P. 897. <https://doi.org/10.1071/PP01093>.

256. Root colonization by beneficial rhizobacteria / Y. Liu, Z. Xu, L. Chen et al. // *FEMS Microbiology reviews*. – 2024. – Vol. 48(1). – P. fuad066. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad066>.

257. Roy, S. Characterization of plant growth promoting feature of a neutromesophilic, facultatively chemolithoautotrophic, sulphur oxidizing bacterium *Delftia* sp. strain SR4 isolated from coal mine spoil / S. Roy, M. Roy // *International journal of phytoremediation*. – 2019. – Vol. 21(6). – P. 531–540. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1537238>.

258. Saravanan, V. S. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* / V. S. Saravanan, M. Madhaiyan, M. Thangaraju // *Chemosphere*. – 2007. – Vol. 66(9). – P. 1794–1798. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.067>.

259. Selenium biofortification: roles, mechanisms, responses and prospects / A. Hossain, M. Skalicky, M. Brestic et al. // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – P. 881. <https://doi.org/10.3390/molecules26040881>.

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

261. Sharan, A. Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources / A. Sharan, Shikha, N.S. Darmwal // World journal of microbiology and biotechnology. – 2008. – Vol. 24(12). – P. 3087–3090. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9807-2>.

262. Shrivastava, M. Phosphate-Solubilizing Microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. Role of rhizospheric microbes in soil / M. Shrivastava, P. C. Srivastava, S. F. D'Souza // Springer singapore. – 2018. – P. 137–165. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0044-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0044-8_5).

263. Siderophore-based microbial adaptations to iron scarcity across the eastern Pacific Ocean / R.M. Boiteau, D.R. Mende, N.J. Hawco et al. // Proceedings of the national academy of sciences. – 2016. – Vol. 113(50). – P. 14237–14242. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608594113>.

264. Siderophores and competition for iron govern myxobacterial predation dynamics / F. J. Contreras-Moreno, A. Moraleda-Muñoz, F. J. Marcos-Torres et al. // The ISME Journal. – 2024. – Vol. 18 (1). – P. wrae077. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae077>.

265. 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 et al. // MethodsX. – 2022. – Vol. 9. – P. 101917. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101917>.

266. Singh, P. Effect of purified alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* on growth of *Zea mays* L. / P. Singh, R. M. Banik // Plant science today. – 2019. – Vol. 6(1). – P. 583–589. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.sp1.676>.

267. Smallholder farmers knowledge, attitudes and practices towards biological control of papaya mealybug in Kenya / K. Constantine, F. Makale, I. Mugambi et al. // CABI Agriculture and bioscience. – 2023. – Vol. 4. – P. 18. <https://doi.org/10.1186/s43170-023-00161-7>.

268. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data / Y. Chen, Y. Chen, C. Shi, et al. // *Gigascience*. – 2018. – Vol. 7(1). – P. 1–6. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix120>.

269. Soil drenching and foliar spray with bioagents for reducing wheat leaf diseases under natural field conditions / M. M. Abdel-Kader, N. S. El-Mougy, M. S. A. Khalil et al. // *Journal of plant diseases and protection*. – 2023. – Vol. 130. – P. 279–291. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00705-z>.

270. 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. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.

271. Sumathy, N. Molecular characterization and plant growth promoting efficacy of *Rhizobium* sp. from sesbania root nodule adopted from madurai region, Tamil Nadu, India / N. Sumathy, R. K. Velu // *Journal of pure and applied microbiology*. – 2025. – Vol. 19(1). – P. 617–632. <https://doi.org/10.22207/JPAM.19.1.51>.

272. Sunithakumari, K. Zinc solubilizing bacterial isolates from the agricultural fields of co-imbatore, Tamil Nadu, India / K. Sunithakumari, S. N. Padma Devi, S. Vasandha // *Current science*. – 2016. – Vol. 110(2). – P. 196. <https://doi.org/10.18520/cs/v110/i2/196-205>.

273. Surfactin: its biological activity and possibility of application in agriculture / O. V. Kisil, V. S. Trefilov, V. S. Sadykova et al. // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2023. – Vol. 59. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1134/S0003683823010027>.

274. Synergistic interaction between *Azotobacter* and *Pseudomonas* bacteria in a growth-stimulating consortium / Yu. Serazetdinova, D. Chekushkina, E. Borodina et al. // *Foods and raw materials*. – 2025. – P. 376–393. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2025-2-651>.

275. Synergy between rhizobial co-microsymbionts leads to an increase in the efficiency of plant–microbe interactions / V. I. Safronova, A. A. Sazanova, A. A. Belimov et al. // *Microorganisms*. – 2023. – Vol. 11. – № 5. – P. 1206. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051206>.

276. Teixidó, N. Insight into a successful development of biocontrol agents: production, formulation, packaging, and shelf life as key aspects / N. Teixidó, J. Usall, R. Torres // *Horticulturae*. – 2022. – Vol. 8. – P. 305. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040305>.

277. Telatin, A. SeqFu: A suite of utilities for the robust and reproducible manipulation of sequence files / A. Telatin, P. Fariselli, G. Birolo // *Bioengineering*. – 2021. – Vol. 8. – P. 59. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050059>.

278. *Thammasittirong* SN-R. Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-Promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23 / S. Saechow, A. Thammasittirong, P. Kittakoo et al. // *Journal of microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 28(9). – P. 1527–1535. <https://doi.org/10.4014/jmb.1804.04025>.

279. The effect of phenazine-1-Carboxylic acid on mycelial growth of *Botrytis cinerea* produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain / A. S. Simionato, M. O. P. Navarro, M. L. A. Jesus et al. // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1102. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01102>.

280. The modification of plant cell wall polysaccharides in potato plants during *Pectobacterium atrosepticum*-caused infection / V. Gorshkov, I. Tsers, B. Islamov et al. // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – P. 1407. <https://doi.org/10.3390/plants10071407>.

281. The non-ribosomal peptide synthetase-independent siderophore (NIS) rhizobactin produced by *Caballeronia mineralivorans* PML1(12) confers the ability to weather minerals / C. N. Blanco, C. Paris, T. Dhalleine et al. // *Applied and environmental microbiology journal*. – 2023. – Vol. 89. – P. e00453-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00453-23>.

282. The role of microbial interactions on rhizobial fitness / M. G. Agudelo, B. Ruiz, D. Capela et al. // *Frontiers in plant science*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1277262. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1277262>.

283. Threath, S. D. Biological nitrogen fixation in theory, practice, and reality: a perspective on the molybdenum nitrogenase system / S. D. Threath, D. C. Rees // *FEBS Letters*. – 2023. – Vol. 597. – P. 45–58. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14534>.

284. 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. – P. 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>.
285. Transcription Factor Spo0A regulates the biosynthesis of diffidin in *Bacillus amyloliquefaciens* / N. Liu, H. Sun, Z. Tang et al. // Microbiology spectrum. – 2023. – Vol. 11. – P. e01044-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01044-23>.
286. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal the antifungal mechanism of the compound phenazine-1-carboxamide on *Rhizoctonia solani* AG11A / Y. Zhang, Q. Li, C. Wang et al. // Frontiers in plant science. – 2022. – Vol. 13. – P. 1041733. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1041733>.
287. Transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* to the predatory attack of *Myxococcus Xanthus* / M. J. Soto, J. Pérez, J. Muñoz-Dorado et al. // Frontiers in microbiology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1213659. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1213659>.
288. Trichoderma species: our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases – a review / P. Guzmán-Guzmán, A. Kumar, S. Santos-Villalobos et al. // Plants. – 2023. – Vol. 12. – P. 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>.
289. Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture / S. L. Woo, M. Ruocco, F. Vinale et al. // The open mycology journal. – 2014. – Vol. 8. – P. 71–126. <http://dx.doi.org/10.2174/1874437001408010071>.
290. Trivedi, G. Synergistic effect of endophytic selenobacteria on biofortification and growth of Glycine max under drought stress / G. Trivedi, P. Patel, M. Saraf // South african journal of botany. – 2020. – Vol. 134. – P. 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.10.001>.
291. 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. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02483-z>.
292. Two novel plant-growth-promoting *Lelliottia amnigena* isolates from *Euphorbia prostrata* aiton enhance the overall productivity of wheat and tomato / M. Parashar, S. K. Dhar, J. Kaur al. // Plants. – 2023. – Vol. 12. – P. 3081. <https://doi.org/10.3390/plants12173081>.

293. Unveiling the antagonistic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* Y010 directs targeted genetic screening for enhanced biocontrol efficacy / Y. Wen, X. Pu, M. Lv et al. // Journal of agricultural and food chemistry. – 2025. – Vol. 73(28). – P. 17685–17695. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c05188>.
294. Venkatesh, G. Circular bio-economy-paradigm for the future: Systematic review of scientific journal publications from 2015 to 2021 / G. Venkatesh // Circular economy and sustainability. – 2022. – Vol. 2. – P. 231–279. <https://doi.org/10.1007/s43615-021-00084-3>.
295. Were, E. Iron necessity for chlamyospore germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense TR4 / E. Were, A. Viljoen, F. Rasche // Biometals. – 2023. – Vol. 36. – P. 1295–1306. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00519-4>.
296. Wessler, J. The Contribution of the Bioeconomy to Sustainable Development / J. Wessler, M. Zhu // Engineering. – 2024. – Vol. 43(12). – P. 26–28. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2024.08.019>.
297. Whiting, S.N. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *thlaspi caer-ulescens* / S.N. Whiting, M.P. De Souza, N. Terry // Environmental Science & Technology. – 2001. – Vol. 35(15). – P. 3144–3150. <https://doi.org/10.1021/es001938v>.
298. 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.
299. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009802>.
300. Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer / H. Kumar, V. K. Bajpai, R. C. Dubey et al. // Crop protection. – 2010. – Vol. 29(6). – P. 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.01.002>.

301. Wu, L. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens / L. Wu, H. Wu, L. Chen // Nature. – 2015. – Vol. 5. – P. 12975. <https://doi.org/10.1038/srep12975>.
302. Xun W. Antifungal Mechanism of Phenazine-1-Carboxylic Acid against *Pestalotiopsis kenyana* / W. Xun, B. Gong, X. Liu // International journal of molecular sciences. – 2023. – Vol. 24(14). – P. 11274. <https://doi.org/10.3390/ijms241411274>.
303. Yravin, D. Y. Natural trojan horse inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases / Yravin, K. Severinov, S. Dubiley // RSC chemical biology. – 2021. – Vol. 2 (2). – P. 468–485. <https://doi.org/10.1039/d0cb00208a>.
304. Zhang, L. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation / L. Zhang, C. Sun // Applied and environmental microbiology. – 2018. – Vol. 84(18). – P. e00445–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>.
305. Zhao, Q. Pyoluteorin-deficient *Pseudomonas protegens* improves cooperation with *Bacillus velezensis*, biofilm formation, co-colonizing, and reshapes rhizosphere microbiome / Q. Zhao, R. Wang, Y. Song // Npj biofilms microbiomes. – 2024. – Vol. 10. – P. 145. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00627-0>.
306. 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.
307. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize / M. Z. Mumtaz, M. Ahmad, M. Jamil et al. // Microbiological research. – 2017. – Vol. 202. – P. 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001>.

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

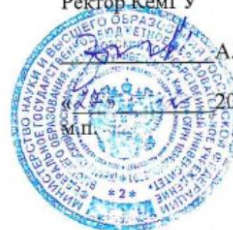
**Приложение А****Копии отчетов на выполнение государственных работ в сфере научной  
деятельности**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

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

УТВЕРЖДАЮ  
Ректор КемГУ  
А.Ю. Просеков  
«15» 12 2024 г.



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

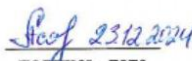
Научный руководитель проекта,  
доктор технических наук, доцент

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.

 23.12.2024  
подпись, дата

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

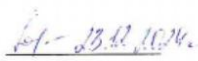
Исполнители:

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

 23.12.2024  
подпись, дата

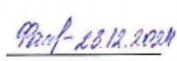
Карчин К.В.  
(раздел 1,  
заключение)

Младший научный сотрудник  
лаборатории фиторемедиации техногенно  
нарушенных экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

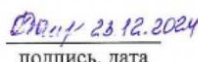
Фотина Н.В.  
(раздел 2, 4,  
приложения)

Младший научный сотрудник  
лаборатории фиторемедиации техногенно  
нарушенных экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

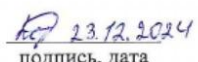
Фасхутдинова Е.Р.  
(раздел 4)

Младший научный сотрудник  
лаборатории фиторемедиации техногенно  
нарушенных экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

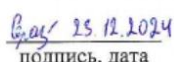
Колпакова Д.Е.  
(раздел 1, 3,  
приложения)

Младший научный сотрудник  
лаборатории фиторемедиации техногенно  
нарушенных экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

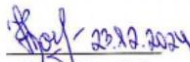
Бородина Е.Е.  
(раздел 2, 3, 4)

Младший научный сотрудник  
лаборатории фиторемедиации техногенно  
нарушенных экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

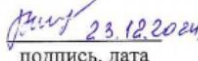
Серазетдинова Ю.Р.  
(раздел 1, 2)

Младший научный сотрудник  
лаборатории фиторемедиации техногенно  
нарушенных экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

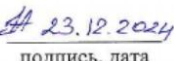
Богачёва  
(Хорошкина) Н.Н.  
(раздел 2, 4)

Лаборант-исследователь лаборатории  
фиторемедиации техногенно нарушенных  
экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

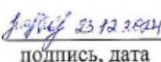
Рыжкова Д.С.  
(раздел 4)

Лаборант-исследователь лаборатории  
фиторемедиации техногенно нарушенных  
экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

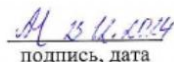
Низоленко А.П.  
(раздел 3)

Лаборант-исследователь лаборатории  
фиторемедиации техногенно нарушенных  
экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

Афонина Ю.Е.  
(раздел 3, 4)

Лаборант-исследователь лаборатории  
фиторемедиации техногенно нарушенных  
экосистем НИУ

 23.12.2024  
подпись, дата

Митина А.Д.  
(раздел 4)

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

12 2025г.

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 (2-й этап)

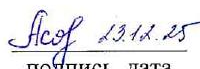
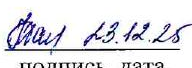
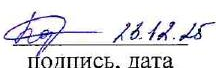
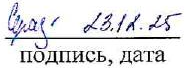
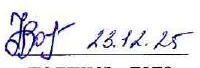
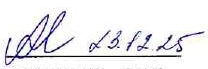
Научный руководитель проекта,  
доктор технических наук, доцент

Л.К. Асякина

«25» 12 2025г.

Кемерово 2025

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

|                                                                                                                             |                                                                                                       |                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Научный руководитель проекта,<br>зав. лабораторией фиторемедиации<br>техногенно нарушенных экосистем НИУ,<br>д.т.н., доцент | <br>подпись, дата   | Асякина Л.К.<br>(введение, раздел 1,<br>заклучение) |
| Исполнители:                                                                                                                |                                                                                                       |                                                     |
| Научный сотрудник лаборатории<br>фиторемедиации техногенно нарушенных<br>экосистем НИУ, к.т.н.                              | <br>подпись, дата   | Карчин К.В.<br>(раздел 1, 2)                        |
| Младший научный сотрудник<br>лаборатории фиторемедиации техногенно<br>нарушенных экосистем НИУ                              | <br>подпись, дата   | Фотина Н.В.<br>(введение, раздел 3,<br>приложения)  |
| Младший научный сотрудник<br>лаборатории фиторемедиации техногенно<br>нарушенных экосистем НИУ                              | <br>подпись, дата   | Фасхутдинова Е.Р.<br>(раздел 1, 2, 3)               |
| Младший научный сотрудник<br>лаборатории фиторемедиации техногенно<br>нарушенных экосистем НИУ                              | <br>подпись, дата   | Колпакова Д.Е.<br>(раздел 2, 3,<br>приложения)      |
| Младший научный сотрудник<br>лаборатории фиторемедиации техногенно<br>нарушенных экосистем НИУ                              | <br>подпись, дата | Бородина Е.Е.<br>(раздел 2, 3,<br>заклучение)       |
| Младший научный сотрудник<br>лаборатории фиторемедиации техногенно<br>нарушенных экосистем НИУ                              | <br>подпись, дата | Серазетдинова Ю.Р.<br>(раздел 1,<br>заклучение)     |
| Младший научный сотрудник<br>лаборатории фиторемедиации техногенно<br>нарушенных экосистем НИУ                              | <br>подпись, дата | Богачёва Н.Н.<br>(раздел 2, 3)                      |
| Лаборант-исследователь лаборатории<br>фиторемедиации техногенно нарушенных<br>экосистем НИУ                                 | <br>подпись, дата | Афонина Ю.Е.<br>(раздел 1, 2, 3)                    |
| Лаборант-исследователь лаборатории<br>фиторемедиации техногенно нарушенных<br>экосистем НИУ                                 | <br>подпись, дата | Митина А.Д.<br>(раздел 2)                           |

## Приложение Б

Диплом победителя программы «Студенческий стартап»



Приложение В  
Патенты на изобретения

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2850674**

**БИОПРЕПАРАТ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА И ЗАЩИТЫ  
ПШЕНИЦЫ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ  
ШТАММОВ ENSIFER И RHIZOVIIUM**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования "Кемеровский  
государственный университет" (RU)*

Авторы: *Серазетдинова Юлия Ренатовна (RU), Колпакова Дарья  
Евгеньевна (RU), Бородинна Екатерина Евгеньевна (RU), Фасхутдинова  
Елизавета Рафаиловна (RU), Афонина Юлия Евгеньевна (RU), Фотина  
Наталья Вячеславовна (RU), Миленьева Ирина Сергеевна (RU),  
Асякина Людмила Константиновна (RU), Просеков Александр  
Юрьевич (RU)*

Заявка № **2025125897**

Приоритет изобретения **20 сентября 2025 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **12 ноября 2025 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **20 сентября 2045 г.**



*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат 00a570e4f7ad18d531b4b8818e75f29506  
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 04.09.2025 по 28.11.2026

*Ю.С. Зубов*

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2861018****СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ  
СУСПЕНЗИИ, ПОВЫШАЮЩЕЙ УСТОЙЧИВОСТЬ  
ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР К ФИТОПАТОГЕНАМ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
"Кемеровский государственный университет" (RU)*

Авторы: *Асякина Людмила Константиновна (RU), Фотина  
Наталья Вячеславовна (RU), Бородина Екатерина  
Евгеньевна (RU), Серазетдинова Юлия Ренатовна (RU),  
Просеков Александр Юрьевич (RU)*

Заявка № **2025128128**Приоритет изобретения **14 октября 2025 г.**Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретенийРоссийской Федерации **28 апреля 2026 г.**Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает **14 октября 2045 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат 00a5706a7d31153154b8818e75f29506  
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 04.09.2025 по 28.11.2026

*Ю.С. Зубов*

**Приложение Г****Копии Технических условий и Технологических инструкций разработанного  
биопрепарата**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ФГБОУ ВО «КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД 2 20.20.19.000

Группа Л16  
(ОКС 65.100.)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-инновационной  
работе ФГБОУ ВО «КемГУ»

/ Жидкова Е.А.

«16» 07 2026 г.

Биопрепарат на основе *Priestia aryabhatai*, *Bacillus subtilis*,  
*Pseudomonas\_E chlororaphis\_I*

**Технические условия****ТУ 20.20.19-319-02068309-2026**

(Утверждены впервые)

Дата введения в действие – 16.07.2026

РАЗРАБОТАНО

ФГБОУ ВО «КемГУ»

Ассистент кафедры бионанотехнологии

Серазетдинова Ю.Р.  
личная подпись

И.о. заведующего кафедрой бионанотехнологии

Асякина Л.К.  
личная подпись

Кемерово

2026

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
ФГБОУ ВО «КЕМЕРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
(ФГБОУ ВО «КемГУ»)

ОКПД 2 20.20.19.000

Группа Л16  
(ОКС 65.100.)

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-инновационной  
работе ФГБОУ ВО «КемГУ»

/ Жидкова Е.А.

16.07.2026 г.

Биопрепарат на основе *Priestia aryabhattai*, *Bacillus subtilis*,  
*Pseudomonas\_E chlororaphis\_I*

Технологическая инструкция

ТИ ТУ 20.20.19-319-02068309-2026

(Утверждена впервые)

Дата введения в действие – 16.07.2026

РАЗРАБОТАНО

ФГБОУ ВО «КемГУ»

Ассистент кафедры бионанотехнологии

личная подпись

Серазетдинова Ю.Р.

И.о. заведующего кафедрой бионанотехнологии

личная подпись

Асякина Л.К.

Кемерово

2026