

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Марийский государственный университет»

На правах рукописи

МАСЛЕННИКОВА СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА

**ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА *PSEUDOMONAS ASPLENI* 11RW ДЛЯ
СОЗДАНИЯ ФУНГИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ**

Специальность: 1.5.11 – Микробиология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Д. х. н., академик РАН
Каракотов Салис Добаевич

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 11 |
| 1.1. Бактерии р. <i>Pseudomonas</i> в качестве PGPR | 11 |
| 1.2. Особенности колонизации псевдомонадами ризосферы растений | 13 |
| 1.2.1. Хемотаксис..... | 13 |
| 1.2.2. Формирование биоплёнок | 14 |
| 1.3. Механизмы положительного влияния псевдомонад на растения..... | 17 |
| 1.3.1. Прямые механизмы положительного влияния псевдомонад на растения..... | 17 |
| 1.3.1.1. Фиксация азота..... | 17 |
| 1.3.1.2. Фосфатмобилизация | 17 |
| 1.3.1.3. Синтез фитогормонов | 18 |
| 1.3.2. Опосредованные механизмы положительного влияния псевдомонад на растения | 21 |
| 1.3.2.1. Синтез антибиотиков | 21 |
| 1.3.2.2. Синтез сидерофоров | 26 |
| 1.3.2.3. Продукция HCN | 28 |
| 1.3.2.4. Синтез летучих органических соединений..... | 29 |
| 1.3.2.5. Индукция системной устойчивости (ISR)..... | 29 |
| 1.4. Практическое применение псевдомонад | 30 |
| 1.5. Заключение по обзору литературы | 33 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 34 |
| 2.1. Создание коллекции бактериальных штаммов..... | 34 |
| 2.1.1. Выделение эндофитных бактерий..... | 34 |
| 2.1.2. Выделение комплекса эпифитных и эндофитных бактерий | 35 |
| 2.1.3. Выделение ризосферных бактерий | 36 |
| 2.1.4. Выделение ризосферных бактерий методом активной колонизации корней..... | 37 |
| 2.2. Анализ фунгицидной активности бактерий из созданной коллекции..... | 37 |
| 2.3. Анализ бактерицидной активности бактерий из созданной коллекции..... | 38 |
| 2.4. Анализ синтеза ИУК..... | 38 |
| 2.5. Анализ синтеза сидерофоров | 39 |
| 2.6. Идентификация бактериальных штаммов | 40 |
| 2.7. Анализ ростстимулирующей активности | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 2.8. Анализ вирулентности, токсичности, токсигенности, диссеминации..... | 41 |
| 2.9. Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств..... | 42 |
| 2.10. Анализ спектра фунгицидного действия штамма <i>P. asplenii</i> 11RW..... | 43 |
| 2.11. Изучение действия летучих соединений штамма на рост мицелия фитопатогенов | 44 |
| 2.12. Изучение действия летучих соединений штамма на прорастание конидий | 44 |
| 2.13. Изучение ростстимулирующего действия летучих соединений штамма..... | 44 |
| 2.14. Изучение фосфатмобилизующей активности..... | 45 |
| 2.15. Изучение продукции аммония | 46 |
| 2.16. Изучение колонизационных свойств штамма в гнотобиотических системах..... | 46 |
| 2.17. Изучение антагонистической активности штамма <i>in planta</i> | 48 |
| 2.18. Глубинное культивирование штамма <i>P. asplenii</i> 11RW..... | 49 |
| 2.19. Создание стабильной композиции и хранение прототипа препарата | 50 |
| 2.20. Изучение эффективности лабораторного образца препарата в сравнении с коммерческими препаратами..... | 50 |
| 2.21. Испытание биологической эффективности опытного образца препарата в полевых условиях..... | 51 |
| 2.21.1. Испытание опытного образца препарата в защите яблони | 51 |
| 2.21.2. Испытание опытного образца препарата в защите винограда | 53 |
| 2.21.3. Испытание опытного образца препарата в защите пшеницы | 55 |
| 2.22. Статистическая обработка данных..... | 56 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 57 |
| 3.1. ПОИСК НОВОГО ШТАММА-АНТАГОНИСТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА | 57 |
| 3.1.1. Выделение бактериальных штаммов | 57 |
| 3.1.2. Анализ бактериальной коллекции и изучение антагонистической и фитогормональной активностей..... | 57 |
| 3.1.2.1. Анализ эндофитной микрофлоры | 57 |
| 3.1.2.2. Анализ комплекса эпифитной и эндофитной микрофлоры | 58 |
| 3.1.2.3. Анализ ризосферной микрофлоры | 58 |
| 3.1.3. Фунгицидная активность потенциального штамма..... | 63 |
| 3.1.4. Продукция сидерофоров потенциальным штаммом | 65 |
| 3.1.5. Ростстимулирующая активность потенциального штамма | 66 |
| 3.1.6. Изучение безопасности потенциального штамма-антагониста | 67 |
| 3.1.7. Заключение к разделу 3.1. | 68 |

| | |
|--|-----|
| 3.2. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ СВОЙСТВА ШТАММА <i>P. ASPLENII</i> 11RW | 68 |
| 3.2.1. Культуральные, физиолого-биохимические свойства штамма <i>P. asplenii</i> 11RW | 68 |
| 3.2.2. Количественный анализ синтеза сидерофоров..... | 70 |
| 3.2.3. Спектр фунгицидного действия штамма | 70 |
| 3.2.4. Влияние летучих соединений штамма <i>P. asplenii</i> 11RW на рост мицелия фитопатогенных грибов..... | 72 |
| 3.2.5. Влияние летучих соединений штамма <i>P. asplenii</i> 11RW на прорастание конидий фитопатогенных грибов | 74 |
| 3.2.6. Ростстимулирующее влияние летучих соединений штамма <i>P. asplenii</i> 11RW | 77 |
| 3.2.7. Бактерицидная активность штамма <i>P. asplenii</i> 11RW | 78 |
| 3.2.8. Синтез ИУК и его производных..... | 79 |
| 3.2.9. Фосфатмобилизующая активность штамма..... | 79 |
| 3.2.10. Продукция аммония..... | 80 |
| 3.2.11. Ростстимулирующая активность штамма <i>P. asplenii</i> 11RW в опыте <i>in vitro</i> | 80 |
| 3.2.12. Ростстимулирующая активность штамма <i>P. asplenii</i> 11RW в опытах <i>in planta</i> | 80 |
| 3.2.13. Колонизирующая способность штамма <i>P. asplenii</i> 11RW | 81 |
| 3.2.14. Антагонистические свойства перспективного штамма в опытах <i>in planta</i> | 82 |
| 3.2.15. Заключение к разделу 3.2 | 84 |
| 3.3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ <i>P. ASPLENII</i> 11RW..... | 85 |
| 3.3.1. Глубинное культивирование штамма <i>P. asplenii</i> 11RW | 85 |
| 3.3.2. Создание стабильной композиции прототипа микробиологического препарата | 88 |
| 3.3.3. Фунгицидная активность лабораторных образцов препарата после периода хранения..... | 92 |
| 3.4. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ОПЫТНОГО ПРЕПАРАТА | 94 |
| 3.4.1. Сравнение эффективности лабораторного образца препарата в опытах с коммерческими микробиологическими препаратами..... | 94 |
| 3.4.2. Испытание эффективности опытного образца препарата в полевых условиях | 96 |
| 3.4.2.1. Испытание опытного образца препарата в защите яблони | 96 |
| 3.4.2.2. Испытание опытного образца препарата в защите винограда | 101 |
| 3.4.2.2.1. Защита против серой гнили | 101 |
| 3.4.2.2.2. Защита против милдью | 104 |
| 3.4.2.2.3. Защита против оидиума | 104 |
| 3.4.2.3. Испытание опытного образца препарата в защите пшеницы | 108 |

| | |
|--|-----|
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 111 |
| ВЫВОДЫ | 113 |
| РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ | 114 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 115 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 117 |
| СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ | 143 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ | 146 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Современное ведение сельского хозяйства невозможно без применения удобрений и средств защиты растений. Так, широкое использование минеральных удобрений, в первую очередь азотных, позволило за последние 50 лет поднять урожайность основных сельскохозяйственных культур более чем в 5 раз. Однако вместе с этим важно отметить, что производство и применение химических пестицидов и агрохимикатов оказывает существенное негативное влияние на окружающую среду и здоровье человека, снижает биоразнообразие, влияет на выброс парниковых газов, ухудшает плодородие почв [1]. Одновременно с этим наблюдается распространение инфекционных болезней сельскохозяйственных культур, связанных с несбалансированным применением средств защиты растений и развитием резистентности к химическим действующим веществам, что приводит к накоплению в зерне и готовых продуктах опасных микотоксинов, продуцируемых различными грибными фитопатогенами.

Таким образом, существует научно-обоснованная необходимость обеспечения современного земледелия высокоэффективными препаратами, не оказывающими на компоненты агроценоза негативного влияния. Чрезвычайно актуальным становится разработка и внедрение новых устойчивых методов ведения сельского хозяйства с использованием экологически безопасных продуктов. Решение обозначенных проблем может быть достигнуто за счет поиска и селекции природных микроорганизмов, безопасных для окружающей среды и человека. Ассоциации растений с полезными бактериями привлекают внимание ученых-микробиологов не только с точки зрения изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и возможного использования данных взаимодействий в практике экологически ориентированного адаптивного растениеводства. Использование биологического потенциала микроорганизмов, населяющих корни и внутренние ткани растений, позволяет создавать высокоэффективные биопрепараты для сельского хозяйства.

В этой связи, большой научный и практический интерес представляют ризобактерии, способствующие росту растений (от англ. Plant growth promotion rhizobacteria, PGPR). В современной научной литературе накоплено достаточно много сведений об использовании бактерий группы PGPR для стимулирования роста растений и увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур [2-4]. Детальное изучение потенциальных возможностей этой группы микроорганизмов является чрезвычайно важной задачей для обеспечения стабильности сельскохозяйственного производства. Возникает обоснованная необходимость повышения

уровня наших знаний о PGPR с целью селекции наиболее активных штаммов-колонизаторов ризосферы и создания конкретных программ успешного адаптивного земледелия.

Наибольшую эффективность среди группы PGPR обычно демонстрируют флуоресцентные виды р. *Pseudomonas*, характеризующиеся широким набором полезных для растений свойств. Псевдомонады способны активно колонизировать корни и продуцировать различные биологически активные метаболиты, что обеспечивает достоверное увеличение урожайности [5]. Положительное влияние псевдомонад связывают с улучшением азотного [6] и фосфорного [7] питания, выделением гормонов [8, 9], продукцией веществ антибиотической природы [10], угнетающих фитопатогенные микроорганизмы, повышением устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам [11] и др.

Большое разнообразие полезных свойств псевдомонад определяет огромный исследовательский интерес к данному роду и выявляет их потенциал для промышленного применения. Перспективы практического использования бактерий р. *Pseudomonas* очевидны и подтверждены многочисленными лабораторными и полевыми исследованиями. Благодаря своему многогранному действию на основе отселектированных штаммов псевдомонад (чаще всего видов *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*) создаются биопрепараты различного назначения: фосформобилизаторы, фитостимуляторы, фунгициды и др. Однако важно отметить, что далеко не все существующие на рынке биопрепараты на основе полезных псевдомонад отвечают высоким требованиям качества и часто характеризуются быстрой гибелью продуцента, коротким сроком хранения и, соответственно, низкой эффективностью продукта. Одновременно с этим, несмотря на множество проводимых исследований, имеется чрезвычайно мало данных, касающихся исследования вида *P. asplenii* и аспектов его применения в сельском хозяйстве. В связи с этим актуальной и важной задачей является исследование малоизученного вида, а также разработка конкурентоспособного препарата на его основе со стабильной препаративной формой, продолжительным сроком хранения и высокой биологической эффективностью.

Целью исследования явился поиск нового штамма-антагониста и обоснование возможности его применения в качестве продуцента для создания фунгицидного биопрепарата с широким спектром действия против фитопатогенов сельскохозяйственных культур.

Задачи исследования:

1. Выделить чистые культуры ризосферных, эндофитных и эпифитных бактерий различных растений и провести скрининг созданной коллекции для отбора наиболее активного антагониста;

2. Изучить культуральные, физиолого-биохимические и хозяйственно-ценные свойства отобранного штамма, оценить его безопасность по отношению к растениям и теплокровным животным;

3. Подобрать состав питательной среды и условия глубинного периодического культивирования отобранного штамма, оценить влияние стабилизирующих добавок на хранение прототипа препарата;

4. Изготовить лабораторные образцы препарата и оценить его эффективность в лабораторных и полевых экспериментах.

Научная новизна. Получены новые данные о возможности применения штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW в сельском хозяйстве в качестве защитного и ростстимулирующего агента. Выявлена высокая способность нового штамма к подавлению широкого спектра фитопатогенных грибов за счет хелатирования ионов железа при помощи сидерофоров и продукции антимикробных летучих метаболитов. Выявлено рострегуляторное действие штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW благодаря синтезу фитогормонов типа ауксинов, фосфатмобилизующей активности и продукции аммония. Впервые создан препарат на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW, демонстрирующий высокую эффективность в защите плодовых и зерновых культур в полевых условиях. Научно-практическая новизна разработки подтверждена патентом РФ.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные расширяют представление о биоразнообразии микроорганизмов, ассоциированных с растениями, а также раскрывают перспективы их применения в качестве объектов агробιοтехнологии.

Коллекции микроорганизмов пополнены 7 новыми культурами: *Pseudomonas asplenii* 11RW (ВКПМ В-13395), *Bacillus amyloliquefaciens* 2RW-2 (ВКПМ В-13578), *Bacillus aryabhatai* BR4 (ВКПМ В-13579), *Paenibacillus mucilaginosus* 27 (ВКПМ В-13582), *Bacillus mojavensis* 1RW (ВКПМ В-13580), *Bacillus subtilis* 1ES (RCAM03132), *Bacillus* sp. 4ES (RCAM03134), характеризующиеся наличием важных хозяйственно-ценных свойств и представляющие интерес для исследований, как в фундаментальном, так и прикладном аспектах.

Выявлены механизмы положительного влияния на рост и развитие растений нового штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW. Апробирована технология получения антимикробного препарата на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW, проведены полевые испытания и получены положительные заключения о проведенных опытах. На основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW был создан микробиологический фунгицид под торговым названием «Биокомполит-Про, Ж», прошедший государственную регистрацию, получивший свидетельство о государственной регистрации пестицида №018-02-3837-1 на срок по 24.10.2032 г. и допущенный к обороту на территории Российской Федерации.

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач применялась совокупность общенаучных и специальных методов. Среди общенаучных методов были использованы сбор информации и анализ литературных источников, систематизация, обобщение, эксперимент, наблюдение, сравнительный анализ.

Среди специальных методов исследования ключевую роль играли микробиологические методы с использованием чистых культур бактерий для анализа их физиолого-биохимических свойств, микроскопия, метод гнотобиологических систем, вегетационные испытания и методы периодического глубинного культивирования.

Полученные результаты обрабатывали статистическими методами: вычисляли средние значения и ошибки среднего значения по вариантам опытов, достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новый штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW обладает комплексом полезных свойств, которые могут быть использованы в практических целях.

2. Способность штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW к подавлению фитопатогенов определяется активным синтезом сидерофоров и летучих экзометаболитов.

3. Оптимизированный состав среды, условия культивирования и добавки способствуют стабильному хранению препарата на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW в течение 3 лет без потери хозяйственно-ценных свойств.

4. Разработанный биопрепарат на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW, обладающий широким спектром и высоким уровнем антагонистической активности против фитопатогенных грибов, обеспечивает высокий уровень биологической эффективности в полевых условиях.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена в секторе биотехнологии отдела биологических исследований АО «Щелково Агрохим» в 2018-2022 гг. Достоверность результатов диссертационной работы обеспечена современными методами исследования и достаточным количеством фактического материала.

Основные результаты работы доложены на Международной научной конференции «Современные проблемы медицины и естественных наук» (Йошкар-Ола, 2019 г.); VII и VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019-2020 гг.); XI Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2019 г.); 72-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2019 г.); IV Всероссийском съезде по защите растений с международным участием «Фитосанитарные

технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России» (Санкт-Петербург, 2019 г.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы интегрированной защиты плодовых, декоративных и лесных культур» (Ялта, 2020 г.).

Публикации. Результаты проведенных исследований опубликованы в 22 научных работах: в 6 статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, из них 2 публикации в журналах, входящих в международные базы Web of Science и Scopus; 3 патентах РФ; 6 статьях в других изданиях, а также 7 публикациях в сборниках научных статей и материалах конференций.

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и постановку задач, сбор и обработку данных, оформление и публикацию полученных результатов.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературных источников, описания методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, приложения, списка используемой литературы, включающего 301 источник. Диссертация изложена на 149 страницах печатного текста, включает 13 рисунков и 57 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактерии р. *Pseudomonas* в качестве PGPR

Псевдомонады – распространенные палочковидные грамотрицательные, хемогетеротрофные, подвижные бактерии. Род *Pseudomonas* относится к γ -подклассу Протеобактерий и включает в основном флуоресцентные бактерии, а также несколько нефлуоресцентных видов. Группа флуоресцентных псевдомонад включает: 1) фитопатогенные цитохром-С-оксидаз-положительные виды (*P. cichorii*, *P. marginalis* и *P. tolaasii*); 2) нефитопатогенные и ненекротические штаммы (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens* и *P. aeruginosa*); 3) фитопатогенные некротические цитохром-С-оксидаз-отрицательные виды (*P. syringae* и *P. viridiflava*). Нефлуоресцентные псевдомонады включают штаммы *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes* и *P. pseudoalcaligenes* [12-14]. Псевдомонады – очень распространенная в природе группа микроорганизмов, встречающихся во многих экологических средах обитания благодаря простым пищевым потребностям и мобильному метаболизму.

Большое разнообразие псевдомонад определяет огромный исследовательский интерес к этому роду. Некоторые виды, такие как *P. aeruginosa*, являются условно-патогенными микроорганизмами человека, проявляющими повышенную устойчивость к антибиотикам, поэтому этот вид является моделью для изучения механизмов этой устойчивости. Другие виды способны разлагать ряд токсичных химических соединений или продуцировать широкий спектр вторичных метаболитов и биополимеров. Это делает эти штаммы перспективными для промышленного применения. Особое внимание исследователей уделено флуоресцентным видам псевдомонад, способным улучшать рост и развитие растений, увеличивать сукцессивность почв, ингибировать развитие фитопатогенов [7, 9, 15] и др.

Устойчивость растений к заболеваниям грибной и бактериальной природы во многом определяется результатом взаимодействия корневой системы с различными микроорганизмами. Активная секреция клетками корня различных метаболитов обеспечивает формирование прочных ассоциаций с микроорганизмами как внутри корня, так и на его поверхности (ризоплане), а также в почве, непосредственно окружающей корни (ризосфере). Наибольший интерес для исследования симбиозов с микроорганизмами представляет ризосфера.

Под ризосферой понимается слой почвы, прилегающий к корням растений и находящийся под их непосредственным влиянием. Корни выделяют большое количество соединений, называемых корневыми экссудатами и являющихся питательным ресурсом для

микроорганизмов [16]. Наличие экссудатов приводит к резкому увеличению микробной популяции в непосредственной близости к корням в сравнении с основным почвенным профилем. Обилие различных источников питания, формирующих градиент, увеличивает микробную конкуренцию в зоне ризосферы, делая ее сложной и неоднородной средой обитания [17].

Микробиом ризосферы крайне разнообразен и часто содержит полезные для растения микроорганизмы. Подобные микробы, относящиеся к группе ризобактерий, способствующих росту растений (PGPR), активно изучаются исследователями-микробиологами [2]. Их потенциал прямого улучшения роста растений и/или подавления развития фитопатогенов является многообещающей практикой для развития устойчивых методов ведения сельского хозяйства.

PGPR включают многие роды бактерий, такие как *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia* и *Pseudomonas* [3]. Особенно активно среди них изучаются псевдомонады, многие из которых являются биоконтрольными агентами, активное изучение которых начинается с 1980-х годов [4].

Штаммы PGPR, принадлежащие к роду *Pseudomonas*, способны подавлять рост некоторых патогенов грибковых и бактериальных фитопатогенов, таких как *Streptomyces scabies*, *P. syringae*, *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* и *Pythium ultimum* [18-20]. Подавление патогенов в первую очередь происходит за счет антибиоза, стимуляции защитных механизмов растений и конкуренции за нишу и питательные вещества, особенно посредством синтеза сидерофоров [21]. Также псевдомонады способны оказывать и прямое стимулирование роста растений за счет солюбилизации фосфатов и железа, азотфиксации, продукции фитогормонов и повышения устойчивости растений к абиотическому стрессу [2, 22, 23].

Способность псевдомонад стимулировать рост растений и подавлять развитие фитопатогенов тесно связана с их способностью активно и конкурентно колонизировать ризосферу и сохраняться в этой области, что определяется как ризокомпетентность [17, 19]. Некоторые авторы даже определяют минимальный порог колонизации, составляющий 10^5 бактерий на грамм корня, необходимый для проявления антибиоза и индукции механизмов системной резистентности растений [21, 24]. Поэтому эффективная колонизация ризосферы перспективными штаммами псевдомонад имеет решающее значение для реализации их потенциала в сельском хозяйстве.

1.2. Особенности колонизации псевдомонадами ризосферы растений

Псевдомонады повсеместно распространены в почвах и способны активно заселять ризосферу растений за счет хемотаксиса: по создающемуся градиенту концентрации корневых экссудатов бактерии движутся к корням, где образуют биоплёнки, позволяющие им прикрепляться к корням и образовывать колонии [25].

1.2.1. Хемотаксис

Хемотаксис – это механизм, позволяющий бактериям двигаться по химическому градиенту [26]. В ризосфере это позволяет бактериям обнаруживать наличие корневых экссудатов и приближаться к местам их высвобождения – кончикам корней. Сайты колонизации могут отличаться в зависимости от вида псевдомонад. Например, два эффективных колонизатора корней авокадо, *P. alcaligenes* AVO73 и *P. pseudoalcaligenes* AVO110, демонстрируют различные стратегии: штамм AVO110 колонизирует корневые раны и межклеточные пространства между эпидермальными клетками корня, тогда как AVO73 образует диспергированные микроколонии на поверхности корня и в непосредственной близости от боковых корней [27].

Существует три типа движения хемотаксиса: плавание, роение и подергивание. Плавание и роение зависят от вращения жгутиков, в то время как подергивание основывается на движениях разгибания-втягивания пилей типа IV [26].

Хемотаксис, обусловленный движениями жгутиков и пилей, контролируется особыми механизмами передачи сигнала. Обнаружение различных соединений в ризосфере опосредуется хеморецепторами, называемыми метил-акцептирующими белками хемотаксиса (от англ. methyl-accepting chemotaxis proteins, MCP). Это гомодимеры трансмембранных белков, обладающие периплазматической лиганд-связывающей областью, специфичной для соединения или группы соединений, и цитозольным метил-акцептирующим доменом, консервативным среди MCP [28]. Большинство MCP псевдомонад, населяющих ризосферу, позволяют обнаруживать аминокислоты, полиамины и органические кислоты, являющихся промежуточными продуктами цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). У *P. putida* KT2440 эти промежуточные соединения являются предпочтительным источником энергии на ранней стадии роста наряду с аминокислотами, которые также могут превращаться в промежуточные продукты ЦТК [29].

Количество MCP тесно зависит от образа жизни бактерии: штаммы, способные колонизировать различные ниши и устанавливать сложные взаимодействия с корнями растений, обладают большим количеством MCP [30]. Было показано, что обитающие в ризосфере штаммы *Pseudomonas* содержат от 27 до 37 генов MCP [31, 32]. Была также

проанализирована экспрессия генов MCP у *P. putida* KT2440 [33]. Было продемонстрировано, что их экспрессия обратно коррелирует с близостью экссудатов корней кукурузы: когда бактерии приближаются к корням, экспрессия генов хеморецепторов снижается, вероятно, потому, что хемотаксис становится менее полезным в непосредственной близости от корней.

Несколько исследований мутантных штаммов псевдомонад, лишенных генов, связанных с хемотаксисом или подвижностью, показали снижение колонизирующей способности ризосферы [34-37]. Оку с соавторами сконструировали несколько мутантов *P. fluorescens* Pf0-1 по нескольким генам MCP, чтобы оценить их комбинированный эффект на колонизацию ризосферы томатов [34, 37]. Они показали, что тройной мутант *ctaA ctaB ctaC* был менее конкурентоспособным, чем мутант дикого типа, а мутант *ctaA ctaB ctaC mcpS mcpT* был еще менее конкурентоспособным. Однако эти мутанты по-прежнему были лучшими колонизаторами, чем мутант *cheA*, у которого отсутствовал хемотаксис, управляемый жгутиками. Это указывает на то, что колонизация ризосферы томатов штаммом *P. fluorescens* Pf0-1 зависит от множества MCP, а не от пяти изученных белков. У *P. fluorescens* F113 мутации в генах *fliC*, *fliS*, *fleQ* и *fliT*, участвующие в синтезе жгутика, снижали или полностью блокировали подвижность, что приводило к более низкой конкурентной колонизации корней люцерны [36].

Чтобы улучшить ризокомпетентность пшеницы, Гао с соавторами попытались усилить хемотаксисную активность *Pseudomonas* sp. UW4 по отношению к 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоте (АЦК) [38]. Это соединение является предшественником этилена в растениях и выделяется в ризосферу, где PGPR могут использовать его в качестве источника углерода и азота с помощью фермента АЦК-деаминазы, кодируемого геном *acdS* [39]. АЦК известна как сильный хемоаттрактант для штамма UW4 [40]. Исследователи использовали *acdS*-дефектный штамм UW4 и дополнили его различными бактериальными промоторами и *acdS*. Они выявили линейную и положительную корреляцию между экспрессией *acdS*, активностью *acdS*, хемотаксисом в отношении АЦК и колонизацией ризосферы пшеницы. Они также показали, что промоторы, индуцирующие высокую экспрессию *acdS* и высокие хемотаксические ответы на АЦК, также усиливают хемотаксис и на другие хемоаттрактанты, такие как аминокислоты и органические кислоты. Эти результаты демонстрируют, что увеличение скорости бактериального метаболизма одного соединения может привести посредством хемотаксиса и других механизмов к усилению ризокомпетентности.

1.2.2. Формирование биоплёнок

Как только полезные для растений псевдомонады оказываются в непосредственной близости к корням, зачастую они образуют биопленки. Биопленка представляет собой

скопление бактерий, объединенных матриксом из высокогидратированных внеклеточных полимерных веществ (от англ. extracellular polymeric substances, EPS), на абиотической или биотической поверхности [41]. Биопленки обеспечивают защиту бактерий от различных факторов, таких как высыхание, действие антибиотиков и др., а также могут улучшить усвоение питательных веществ [41].

Развитие биопленки происходит в несколько этапов, включающих обратимое прикрепление, необратимое прикрепление, образование микроколоний, созревание и распространение бактерий [42].

Прикрепление бактерий к корням растений или частицам почвы опосредуется адгезинами. Они представляют собой вязкие структуры, в основном белки, выделяющиеся бактериями для прикрепления к поверхности, хозяину или другим бактериям [43]. Многие адгезины были идентифицированы у населяющих ризосферу псевдомонад, например, большие адгезионные белки LapA и LapF [44-46], средний адгезионный белок MarA [47] и сам жгутик [45].

Как только бактерия необратимо прикрепляется к биотической или абиотической поверхности в ризосфере, она начинает размножаться, образуя микроколонию, переходящую в зрелую биопленку [42]. Такой переход приводит к сдвигу экспрессии генов: экспрессия генов, участвующих в движении, ингибируется, в то время как экспрессия генов, связанных с биосинтезом EPS, усиливается [48]. EPS – это в основном полисахариды, белки, ДНК и липиды, обеспечивающие структурную стабильность биопленки и формирующие внешнюю «пищеварительную систему» бактерий за счет удержания внеклеточных ферментов [41]. У *P. putida* KT2440 имеется четыре кластера генов, ответственных за продукцию экзополисахаридов, формирующих матрицу биопленки: *rea* и *reb*, *alg* и *bcs* [49, 50]. Они являются структурными стабилизаторами биопленки. Однако мутант, лишенный всех четырех кластеров генов, все еще способен образовывать биопленку [50], что указывает на то, что в ее формировании участвуют другие компоненты матрикса. Маршалл с соавторами показали, что мутанты *P. fluorescens* Pf0-1, лишенные генов *alg*, демонстрируют сниженную колонизирующую способность по сравнению с диким типом, что подчеркивает важность этого полисахарида [51]. Были идентифицированы и другие опероны биосинтеза экзополисахаридов у обитающих в ризосфере псевдомонад, в частности штамма *P. protegens*: *Psl* и *Pel* [52, 53]. Ассоциированные полисахариды *Psl* и *Pel* также были изучены у *P. aeruginosa* [54]. *Psl* представляет собой повторяющийся пентамер, содержащий маннозу, глюкозу и рамнозу, в то время как структура *Pel* остается неизвестной, однако предполагается, что он может представлять собой целлюлозоподобный полимером глюкозы [55].

Было также показано, что внеклеточная ДНК играет важную роль в формировании биопленок псевдомонад [56]. Внеклеточная ДНК продуцируется путем лизиса клеток, высвобождая фрагменты размером от 10 до 30 т.п.н. [57]. Эти фрагменты связываются с другими биополимерами в биопленке (экзополисахаридами или белками), что увеличивает ее целостность [58]. Другой компонент, участвующий в формировании биопленки, – это белок LapF [46]. LapF является вторым по величине белком у *P. putida* KT2440 после LapA, состоящим из 6310 аминокислот [59]. Мутант lapF все еще способен необратимо прикрепляться к поверхности, но не может образовывать микроколонии и зрелые биопленки, а также колонизировать корни растений на конкурентной основе. LapF необходим для созревания биопленки и ее трехмерного развития. Также был идентифицирован другой LapA-подобный белок, MarA [47]. Интересно, что MarA экспрессируется только на нижней части больших и толстых биопленок, где кислород и питательные вещества менее доступны, чем во внешних частях биопленки, что указывает на потенциальную роль в структурной адаптации биопленок для улучшения доступа к кислороду и питательным веществам [43]. Однако его более точную функцию еще предстоит расшифровать. В состав матрикса биопленки также входит муцигель, продуцируемый корнями растений и в основном содержащий экзополисахариды [60, 61].

При истощении кислорода и питательных веществ и накоплении продуктов метаболизма и токсинов в биопленке может быть инициирован процесс ее растворения для обеспечения выживания и распространения клеток [62, 63]. Это позволяет бактериям находить лучшие условия для своего развития и образовывать новые биопленки. Внутри ризосферы распространение бактерий может происходить вслед за участками корневой экссудации, которые динамически перемещаются при росте корневой системы [64].

Хотя формирование биопленок имеет множество преимуществ для бактерий, это не всегда лучшая стратегия, применяемая псевдомонадами для эффективной колонизации ризосферы. Барахона с соавторами показали, что гипермобильный штамм *P. fluorescens* F113, неспособный образовывать полностью зрелую биопленку на абиотической поверхности и образовывать матрикс биопленки в ризоплане, не разрушается при конкурентной колонизации верхушек корней люцерны [65]. В ризосфере клетки этого штамма были окружены растительным муцигелем, который частично может действовать как матрикс биопленки для защиты бактерий. Эти результаты показывают, что псевдомонады могут использовать различные стратегии создания биопленок для колонизации ризосферы.

1.3. Механизмы положительного влияния псевдомонад на растения

1.3.1. Прямые механизмы положительного влияния псевдомонад на растения

Действие псевдомонад на растения можно разделить на прямое и косвенное. К прямому непосредственному влиянию относится улучшение усвоения питательных веществ растениями за счет фиксации псевдомонадами азота, минерализация питательных веществ и синтез фитогормонов.

1.3.1.1. Фиксация азота

Важным свойством PGPR бактерий является способность перевода атмосферного азота в усвояемую для растений форму, осуществляемого ферментом нитрогеназой. Применение таких бактерий способно значительно снизить использование азота в виде химических удобрений и улучшить урожайность сельскохозяйственных культур.

К настоящему времени процесс фиксации азота псевдомонадами, а также способ защиты нитрогеназы от кислорода, изучен недостаточно полно. Известно немного псевдомонад, способных осуществлять несимбиотическую азотфиксацию. Изучен штамм *Pseudomonas* sp. SUT 19, способный фиксировать азот, растворять неорганические фосфаты, продуцировать ИУК и стимулировать рост кукурузы, однако уровень фиксации азота был ниже, чем эталонных штаммов *Azospirillum* sp. и *Azotobacter* sp. [66]. Из ризосферы сахарной свёклы были выделены штаммы *P. koreensis* CY4 и *P. entomophila* CN11, нитрогеназная активность которых была подтверждена наличием *nif*-генов. Помимо этого штаммы обладали фосфатмобилизующей активностью, продуцировали ИУК и АЦК-дезаминазу и, как следствие, стимулировали рост растений [6].

1.3.1.2. Фосфатмобилизация

Фосфор является вторым по важности для растений элементом. Он участвует в построении многих макромолекул в клетке, таких как ДНК, РНК, АТФ и фосфолипиды. Он необходим для нормального роста и развития растений, положительно влияет на цветение, формирование и созревание семян. Кроме того, он повышает сопротивляемость болезням, увеличивает жесткость побегов и стимулирует развитие корневой системы [67]. Однако 95-99% почвенного фосфора представляют собой иммобилизованные и недоступные соединения. Функцию растворения фосфатов и их перевода в усвояемую форму осуществляют бактерии, ассоциированные с растениями.

Механизмы солиubilизации неорганических фосфатов включают синтез почвенными бактериями органических низкомолекулярных кислот, например, глюконовой и лимонной. С другой стороны, минерализация органических фосфатов происходит за счет бактериального

синтеза фосфатаз, таких как фитаза и нуклеаза, которые катализируют гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты с высвобождением фосфатной группы [68]. Важным фактом является то, что солюбилизация неорганического фосфора и минерализация органического фосфора – это возможности, которые могут осуществляться одним и тем же бактериальным штаммом [69]. Так, сообщается о штамме *Pseudomonas* sp. SCPG-7, способном растворять фосфаты за счет синтеза щелочной фосфатазы и органических кислот (2-кето-D-глюконовая, α -кетоглутаровая, янтарная и другие кислоты), а также проявляющем рострегуляторное действие на перец стручковый, фиксируемое по увеличению высоты растений и их сухой биомассы [70].

1.3.1.3. Синтез фитогормонов

Известно, что многие виды псевдомонад способны продуцировать фитогормоны, такие как индолуксусная кислота (ИУК), цитокинины, гиббереллины и ингибиторы этилена, что способствует увеличению поглощающей поверхности корней для воды и питательных веществ и улучшению развития растений.

Ауксины

Ауксины, в частности индол-3-уксусная кислота (ИУК), являются важным классом фитогормонов, продуцируемым многими штаммами PGPR. Известно, что ИУК стимулирует как быстрые (например, удлинение клеток), так и долгосрочные (например, деление и дифференцировка клеток) ответы у растений. Растение, подвергающееся длительному воздействию ИУК, имеет более развитые корни, что, в свою очередь, улучшает поглощение питательных веществ, что в конечном итоге способствует росту всего растения [71, 72].

Многие виды псевдомонад способны продуцировать ауксины и увеличивать длину и площадь корневой системы, а также изменять ее пространственную конфигурацию [7, 8]. Влияние ауксина на архитектурные изменения корня было продемонстрировано инокуляцией *P. aeruginosa*, которая сопровождалась повышенной экспрессией ауксин-отзывчивого гена [73]. Также было показано, что *P. aeruginosa*, *P. putida* и *P. fluorescens* могут модулировать пространственную конфигурацию корневой системы посредством ауксин-сигнальной системы, опосредованной циклодипептидами [8, 73]. Важно отметить, что эффект ауксина зависит от его концентрации. Инокуляция увеличивающимися дозами штаммов *Pseudomonas* давала положительный результат до определенной концентрации, выше которой наблюдалось ингибирующее действие [9].

Известно, что PGPR бактерии способны изменять концентрацию ауксина в растениях-хозяевах не только за счет синтеза, но и путем его разложения. Например, *P. putida* 1290 может

использовать ИУК в качестве питательного субстрата, тем самым устраняя ингибирующее действие высоких уровней экзогенной ИУК на растение [74].

Некоторые бактерии способны также синтезировать вещества с ауксин-подобной активностью. Так, в культуральной жидкости мутантных штаммов *P. aeruginosa lasI* и *P. aeruginosa rhII/lasI*, дефицитных по генам, являющихся частью сигнального механизма N-ацил-L-гомосерин-лактона, были обнаружены циклопептиды. Эти же соединения, но в меньшем количестве, были обнаружены и у дикого типа [73]. Было выявлено, что мутантные штаммы *lasI* и *rhII/lasI* обладают большим стимулирующим действием на рост главного и боковых корней *Arabidopsis thaliana*, чем дикий тип.

Этилен

Этилен – важный фитогормон, участвующий в созревании плодов, старении листьев, функционировании апикальных меристем корня и побега, формировании устьиц и др. Многие штаммы PGPR способны экспрессировать АЦК-дезаминазу и снижать количество этилена в растении за счет разложения АЦК, предшественника этилена [75]. Гены синтеза этого фермента обнаруживаются среди бактерий родов *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* и *Enterobacter* [76]. Известно, что штаммы АЦК-дезаминазной активностью, смягчают действие абиотических стрессов, таких как засоление, загрязнение почвы тяжелыми металлами и органическими загрязнителями, наводнение, засуха и дефицит минералов [77, 78].

Интересно, что после инокуляции семян *A. thaliana* штаммами PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *P. putida* UW4, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K и *Mesorhizobium loti* MAFF303099 положительное влияние на длину корневых волосков отмечалось как при интродукции мутантов с дефицитом *AcdS* (ген, кодирующий АЦК-дезаминазу), так и диких типов. Более того, мутантные штаммы имели более сильный стимулирующий эффект, чем штаммы дикого типа. Кроме того, инокуляция растений *A. thaliana* мутантным по *AcdS* штаммом *P. putida* UW4 приводила к статистически значимому увеличению числа боковых корней по сравнению с вариантом инокуляции диким типом [79].

Цитокинины

Цитокинины – это класс растительных гормонов, представленный группой N⁶-замещенных производных аденина, участвующих в клеточном цикле [80]. Баланс ауксина и цитокинина определяет функционирование меристемы, архитектуру корневой системы, формирование боковых органов побега и развитие генеративных органов [81]. Цитокинины

регулируют биосинтез хлорофилла и биогенез хлоропластов [82]. Они также участвуют в формировании устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам [83, 84].

Известно, что многие штаммы PGPR способны синтезировать цитокинины [85]. Было показано, штамм *P. fluorescens* 6-8, продуцирующий цитокинин, стимулировал рост главного корня и ингибировал образование боковых корней рапса [86].

Бактериальные цитокинины также способствуют резистентности растений к биотическим и абиотическим стрессам. Например, *P. fluorescens* G20-18, продуцирующий цитокинин, повышал устойчивость *A. thaliana* к *P. syringae*, тогда как мутант, неспособный к синтезу цитокининов, никак не влиял на устойчивость растений [87]. Таким образом, способность бактерий синтезировать цитокинины или изменять гомеостаз цитокининов растений критически важна для понимания механизмов PGPR-зависимой стимуляции роста и повышения устойчивости.

Абсцизовая кислота

Абсцизовая кислота (АБК) – это растительный гормон, который синтезируется в ответ на абиотические стрессы (засуха, холод, солевой стресс, загрязнение почвы) и активирует гены, ответственные за устойчивость к стрессу [88]. Он подавляет прорастание семян, вызывает старение растений и опадание листьев и плодов, способствует закрытию устьиц и влияет на архитектуру корневой системы [88].

Известно, что некоторые штаммы PGPR могут синтезировать АБК [89]. Проведенные исследования показывают, что после инокуляции растений АБК-синтезирующими штаммами *Bacillus licheniformis* Rt4M10, *P. fluorescens* Rt6M10, *Azospirillum brasilense* Sp 245, увеличивалось содержание АБК и растения становились более устойчивыми к засухе [89, 90].

Некоторые бактерии могут синтезировать одновременно несколько фитогормонов [91]. Эти фитогормоны могут быть антагонистами друг друга, выполняя противоположные функции для растений. Например, *B. licheniformis* Rt4M10 и *P. fluorescens* Rt6M10 [90] и ряд штаммов, выделенных из галофита *Prosopis strombulifera* [92], способны синтезировать как АБК, так и гиббереллины и цитокинины, являющиеся антагонистами АБК. Однако до сих пор не выяснено, как достигается баланс фитогормонов при инокуляции растений такими бактериями.

Салициловая и жасмоновая кислота

Растения обладают системной устойчивостью двух основных типов: системная приобретенная устойчивость (от англ. systemic acquired resistance, SAR), связанная с сигнальными путями салицилата и этилена; и индуцированная системная устойчивость (от

англ. induced systemic resistance, ISR), связанная с сигнальными путями жасмоната и этилена [93].

Обнаружено, что некоторые штаммы PGPR способны синтезировать жасмоновую и салициловую кислоту. Так, при изучении метаболических изменений сорго двуцветного, инокулированных ризосферными штаммами р. *Pseudomonas* и *Bacillus*, было выявлено индуцирование системной устойчивости растений к засухе посредством комплекса механизмов, включающих синтез жасмоната, салицилата, брассинолидов, АЦК-деаминазы, фитогормонов и других сигнальных молекул [94]. Инокуляция растений штаммами *P. fluorescens* Pf4 и *P. aeruginosa* Pa9 приводила к повышению эндогенного уровня салициловой кислоты в различных частях растений [95]. Штамм *P. putida* MTCC5279 увеличивал экспрессию гена синтеза конъюгата жасмонат-изолейцин JAR1 в растениях *A. thaliana* [96].

Также многие микроорганизмы могут использовать антагонизм между сигнальными путями жасмоновой и салициловой кислоты для увеличения колонизирующей растения способности. Например, патоген *P. syringae* может синтезировать вещества, подобные конъюгату жасмонат-изолейцин (активная форма жасмоновой кислоты в растении), для подавления SAR [97].

1.3.2. Опосредованные механизмы положительного влияния псевдомонад на растения

1.3.2.1. Синтез антибиотиков

Псевдомонады способны производить широкий спектр антимикробных соединений [10]. Эти соединения включают феназины, циклические липопептиды, поликетиды, бактериоцины, эффекторы системы секреции типа VI и другие вторичные метаболиты, такие как трополоны.

Феназины

Феназины представляют собой азотсодержащие гетероциклические молекулы, обладающие широким спектром действия против многих фитопатогенов [18]. Например, была показана их активность против *Rhizoctonia solani* [98-101], *Macrophomina phaseolina* [98], *Fusarium oxysporum* [98], *Alternaria alternata* [98], *Sclerotium rolfsii* [98], *Magnaporthe grisea* [100], *Fusarium graminearum* [100] и *Phytophthora infestans* [102, 103].

Основные феназины, продуцируемые ассоциированными с растениями псевдомонадами, представляют собой феназин-1-карбоновую кислоту (PCA), 2-гидроксифеназин-1-карбоновую кислоту (2-ОН-PCA), 2-гидроксифеназин (2-ОН-PHZ) и феназин-1-карбоксамид (PCN). Их механизмы действия еще до конца не выяснены, однако предполагается, что их антагонизм связан с окислительно-восстановительной активностью [104]. Пиоцианин, соединение феназина, продуцируемое *P. aeruginosa*, может легко проникать через биологические мембраны

[105] и принимать электроны от восстановителей, таких как НАДФН / НАДН [106]. В свою очередь, восстановленный пиоцианин может реагировать с кислородом с образованием токсических активных форм кислорода, таких как супероксид и перекись водорода.

Роль феназинов псевдомонад не ограничивается антибиозом. Было показано, что феназины вызывают индуцированную системную устойчивость табака [107], фасоли и риса [11]. Концентрации PCN от 0,1 до 1 мкмоль/л⁻¹ было достаточно для запуска ISR у риса против *Magnaporthe oryzae*, тогда как мутант CMR12a, дефектный по продукции феназина, утрачивал способность индуцировать ISR [11].

Было также показано, что продукция феназина напрямую участвует в конкурентной колонизации ризосферы [108]. Маццола с соавторами сконструировали мутанты *P. chlororaphis* 30-84 и *P. synxantha* 2-79, дефектные по синтезу феназина, и инокулировали их в нестерильные и стерильные почвы, засеянные пшеницей. Они показали, что количество мутантов в нестерильной почве снижалось быстрее, чем популяции дикого типа, чего не происходило в стерильной почве. Это говорит о том, что феназины участвуют в способности штаммов конкурировать с микробиомом почвы.

Было изучено влияние производимых феназиновых соединений на ризокомпетентность пшеницы в течение нескольких циклов роста [109]. Ученые не выявили каких-либо различий в колонизации между мутантами, продуцирующими различные производные феназина. Однако было показано, что мутант, неспособный продуцировать какой-либо феназин, колонизировал ризосферу в меньшей степени, чем мутант, продуцирующий по крайней мере одно соединение феназина, подтверждая результат, полученный Маццола с соавторами. Исследователи также изучили роль феназинов в формировании биопленок, и было доказано, что синтез феназинов напрямую влияет на их образование и дисперсию [110, 111]. Также было выявлено, что на количество матрикса биопленки влияет тип производного феназина [109]. Это свойство объясняется влиянием феназина на лизис клеток биопленок и высвобождение в матриксе внеклеточной ДНК [112].

Еще одно интересное свойство феназинов, особенно пиоцианина, – их электрон-транспортная активность. Они могут принимать электроны от НАДФН и переносить их за пределы бактерий, чтобы восстанавливать гидроксид железа, особенно в средах, где концентрация кислорода слишком мала для использования кислорода в качестве конечного акцептора электронов, например, в биопленках [18, 113]. Эта активность может использоваться клетками в качестве окислительно-восстановительного буфера и в качестве механизма мобилизации железа. Таким образом, феназины играют роль в колонизации ризосферы не только за счет подавления микробных конкурентов, но также за счет улучшения структуры биопленок, доступности железа и анаэробного дыхания.

Циклические липопептиды

Циклические липопептиды (ЦЛП) представляют собой очень разнообразные поверхностно-активные вещества с антимикробной активностью. Их структура, биосинтез и биологическая активность были изучены Геуденсом и Мартинсом [114] и Гётсе и Сталфортом [115]. ЦЛП содержит циклический олигопептид (8-25 аминокислот) и линейную жирную кислоту. ЦЛП продуцируются нерибосомными пептидными синтетазами, которые представляют собой мультимодульные мегаферменты, в некоторых случаях имеющие молекулярную массу больше 1,0 МДа [115]. Считается, что антимикробная активность ЦЛП связана с повреждением мембраны, в частности с образованием пор [116]. Однако их структурное разнообразие предполагает и другие потенциальные способы антимикробного действия, которые еще предстоит изучить [114]. Подобно феназинам, роль ЦЛП выходит за рамки антагонизма: они могут по-разному влиять на формирование и распространение биопленок в зависимости от продуцируемого ЦЛП. Например, массетолит А улучшает формирование биопленок у *P. fluorescens* SS101 [117], в то время как вискозин облегчает распространение клеток в биопленках *P. fluorescens* SBW25 [118]. Они также могут способствовать подвижности, то есть быстрому перемещению бактерий по поверхности, снижая критическое поверхностное натяжение жидкостей [119]. Это было продемонстрировано на множестве колонизирующих ризосферу штаммов, таких как *P. fluorescens* SBW25 и *P. protegens* Pf-5, продуцирующих вискозин и орфамид А соответственно [114].

Поликетиды

Поликетиды представляют собой структурно и функционально разнообразный класс вторичных метаболитов, продуцируемых бактериями и грибами, с антимикробными, терапевтическими и фитотоксическими свойствами [10]. Биосинтез поликетидов похож на биосинтез жирных кислот и опосредуется поликетидсинтазами (ПКС) [120]. У полезных для растений псевдомонад основными описанными поликетидами являются 2,4-диацетилфлороглюцин (2,4-ДАФГ), мупироцин и пиолютеорин [15]. 2,4-ДАФГ играет важную роль в формировании супрессивных почв и подавляет развитие фитопатогенных грибов за счет своей протонно-ионофорной активности [121]. Мупироцин напрямую ингибирует бактериальную изолейцил-тРНК-синтетазу, что приводит к нарушению биосинтеза белка. Пиолютеорин также антагонистически влияет на микроорганизмы, особенно в отношении *Rhizium ultimum* [122]. Биосинтез этих трех поликетидов опосредуется ПКС и другими белками, кодируемыми кластерами генов *phl*, *mmp* / *mup* / *masr* и *plt* [123-125]. Хотя открытие генов биосинтеза мупироцина датируется 2003 годом, исследования все еще продолжаются, чтобы изучить роль каждого из многочисленных вовлеченных генов, учитывая сложность пути

биосинтеза [126]. Интересно, что механизм совместной регуляции был недавно описан в биосинтезе 2,4-ДАФГ и пиолютеорина у *P. protegens* Pf-5 [127]. Ян с соавторами показали, что белок, кодируемый кластером генов пиолютеорина, превращает промежуточное соединение биосинтеза 2,4-ДАФГ во внутри- и межклеточные сигналы, способные индуцировать экспрессию генов биосинтеза пиолютеорина. Эта совместная регуляция может позволить бактериям производить один или другой поликетид в зависимости от условий окружающей среды и особенно от присутствия микробных конкурентов вместо того, чтобы тратить энергию на производство обоих [127].

Бактериоцины

Бактериоцины – это секретируемые пептиды и белки с антимикробным действием против близкородственных микроорганизмов [128]. Большинство других противомикробных соединений, продуцируемых псевдомонадами, эффективны против филогенетически далеких микроорганизмов и редко действуют против бактерий, принадлежащих к одному роду [129]. Следовательно, бактериоцины играют важную роль в контроле близкородственных бактерий, особенно *Pseudomonas* spp. [130]. Они включают широкий спектр структурно и функционально разнообразных соединений. Разнообразие бактериоцинов, геномика, структура, транспорт и биологические свойства в пределах рода *Pseudomonas* были подробно рассмотрены Геквайером и Де Мотом [128]. Первое обнаружение и идентификация бактериоцина псевдомонад датируется 1954 годом у *P. pyocyanea* (теперь известной как *P. aeruginosa*) Якобом, который назвал обнаруженное вещество «пиоцин» по аналогии с колицинами, которые являются бактериоцинами у *Escherichia coli* [131]. К настоящему времени были обнаружены и другие бактериоцины псевдомонад, что привело к классификации семейства пиоцинов на различные типы: пиоцины S-, R- и F-типа [132]. Псевдомонады также продуцируют и другие бактериоцины, такие как белки горячих точек перестановки (Rhs), лектин-подобные бактериоцины, микроцины и систему контакт-зависимого ингибирования [128]. Бактериоцины влияют на клетки посредством нуклеазной активности против ДНК, тРНК и рРНК, дезорганизации клеточной стенки или деполяризации мембраны за счет образования пор [128].

Системы секреции типа VI

Системы секреции типа VI (от англ. type VI secretion systems, T6SS) представляют собой сократительные системы наподобие бактериофагов, способные вводить токсичные эффекторы в соседние клетки [133]. T6SS и их эффекторы могут воздействовать на бактерии одного и разноимённого рода, а также в отличие от бактериоцинов могут влиять на эукариотические клетки [128]. Их основная роль у ассоциированных с растениями бактерий, по-видимому,

заключается в межбактериальной конкуренции [134]. Было показано, что несколько полезных для растений штаммов *Pseudomonas* несут по крайней мере один кластер генов T6SS и могут содержать до четырех отдельных кластеров [134]. Они также обладают множеством эффекторных генов [135]. За ними обычно следуют гены, кодирующие белки иммунитета, которые защищают штаммы-продуценты от токсического действия родственных эффекторов [128]. Например, Бернал с соавторами идентифицировали у *P. putida* KT2440 десять пар эффекторного иммунитета T6SS, включая предполагаемые нуклеазы, порообразующие колицины и НАДФ+ гликогидролазу [136]. Они также показали, что специфический T6SS, называемый K1, отвечает за подавление множества бактериальных фитопатогенов.

К настоящему времени еще не была выяснена роль T6SS псевдомонад в колонизации ризосферы растений. Однако это было изучено на эндофитах риса, принадлежащими к роду *Kosakonia*, которые также являются грамтрицательными бактериями [137]. Москито с соавторами показали, что мутант с отсутствующей T6SS демонстрирует пониженную колонизацию ризопланы риса по сравнению с диким типом, что указывает на роль T6SS в колонизации и, в конечном итоге, во взаимодействии растение-бактерия. T6SS также участвует в мобилизации железа. Чен с соавторами показали, что T6SS у *P. taiwanensis* CMST влияет на продукцию пиовердина – хелатора железа [138], однако механизм до конца не был выяснен.

Трополоны

Трополоны – небензоидные семичленные ароматические соединения, содержащие карбонильную группу [139]. В первую очередь были описаны у грибов и растений, но также и у некоторых штаммов *Pseudomonas*, в частности была показана их антибиотическая и хелатирующая железо активности. Штаммы, продуцирующие трополоны, были выделены из разных мест обитания, например *P. donghuensis* DSM 101685 был изолирован из воды озера [140], *P. donghuensis* SVBP6 – из почвы [141]. Этот штамм подавляет развитие несколько грибковых патогенов растений, продуцируя 7-гидрокситрополон. Интересно, что изначально это соединение было идентифицировано по его хелатирующей железо активности у *P. donghuensis* DSM 101685 [140]. Таким образом, противогрибковое действие, описанное Муцио с соавторами, у *P. donghuensis* SVBP6 можно объяснить свойством, способствующим истощению запасов железа в ущерб другим микроорганизмам [141]. Однако ученые предлагают другое объяснение, показывая, что добавление железа не влияло на ингибирование роста грибов и не останавливало биосинтез 7-гидрокситрополон. Они предположили, что механизм, лежащий в основе противогрибковой активности трополона, может быть прямым ингибированием эукариотических ферментов, содержащих двухвалентные ионы, такие как Cu^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+}

[142]. Однако точные антибактериальные механизмы действия 7-гидрокситрополона еще предстоит выяснить.

1.3.2.2. Синтез сидерофоров

В дополнение к прямому подавлению микробных конкурентов за счет синтеза антибиотиков полезные для растений псевдомонады также способны эффективно конкурировать за железо. Даже при высоком содержании в почве этот элемент обладает низкой доступностью для бактерий из-за нерастворимости оксидов железа [143]. Поскольку железо важно для метаболизма многих микроорганизмов, за его ресурс возникает конкуренция, особенно обостряющаяся в ризосфере [22]. Эта конкуренция может привести к ингибированию патогенов растений, что делает голодание по железу одним из основных механизмов биоконтроля [21]. Чтобы получить доступ к железу, многие виды бактерий и грибов продуцируют низкомолекулярные (< 10 кДа) связывающие железо соединения, называемые сидерофорами [144]. Бактериальные продуценты сидерофоров обнаруживаются среди родов *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Burkholderia* и *Enterobacter* [145-149].

На данный момент известно около 500 различных сидерофоров. По химическому строению многие сидерофоры представляют собой модифицированные пептиды, в которых определённые группы участвуют в формировании железосвязывающего центра. Существует 4 группы сидерофоров: катехолаты, гидроксаматы, салицилаты и карбоксилаты. Наиболее часто встречающиеся сидерофоры гидроксаматного типа, обладающие высокой устойчивостью к кислым условиям [150].

Ризосферные псевдомонады чаще всего синтезируют основной сидерофор пиовердин [151] и дополнительно один из вторичных сидерофоров, таких как ахромобактин, энантио-пиохелин, псевдомонин, 7-гидрокситрополон, гемофорный белок и др. [135, 140, 152, 153]. Пиовердин обычно синтезируется при сильном дефиците железа, поскольку обладает высокой связывающей способностью [154], тогда как вторичные сидерофоры могут иметь альтернативные функции.

Биосинтез сидерофоров осуществляется с участием нерибосомальных пептидных синтетаз (пиовердин, энантио-пиохелин и псевдомонин) или другими путями (ахромобактин или гемофор через *acs* и *has* гены соответственно) [155-157]. В условиях роста микроорганизмов при дефиците железа происходит индукция биосинтеза сидерофоров. После секреции сидерофор захватывает трехвалентное железо и комплекс лиганда с железом (ферросидерофор) активно возвращается в клетки посредством TonB-зависимого рецептора внешней мембраны [158]. В периплазме железо отделяется от сидерофора посредством

модификации или деградации и транспортируется в цитоплазму, в то время как сидерофор может снова секретироваться наружу [159]. Псевдомонады также способны поглощать сидерофоры, продуцируемые другими микроорганизмами, чтобы увеличить поступление железа и, в конечном итоге, контролировать своих конкурентов [160]. Это возможно благодаря наличию в их геномах множества генов TonB-зависимых рецепторов [158]. Хартни с соавторами идентифицировали 45 из этих белков в геноме *P. protegens* Pf-5 [161]. Предполагается, что они могут быть вовлечены для приобретения и других питательных элементов, а не только железа.

При колонизации корней продуцентами сидерофоров происходит снабжение растения железом путем прямого распада комплекса или обмена лигандами. Многие исследования подтверждают улучшение роста и развития растений, а также их урожайности за счет снабжения железом через бактериальные сидерофоры [162-164].

Помимо связывания железа сидерофоры могут участвовать в антибиозе, передаче сигналов, защите от окислительного стресса [165-166], могут связывать ионы других металлов, таких как медь, молибден, вольфрам, цинк [166-169].

Большое внимание исследователей уделяется антагонистической функции сидерофоров. Их роль в биоконтроле *Erwinia carotovora* была продемонстрирована Клоеспером с соавторами [170], которые первыми выделили флуоресцентный сидерофор псевдобактин и использовали штамм *P. fluorescens* B10 в качестве агента биоконтроля. Было показано, что многие штаммы псевдомонад, продуцирующие сидерофоры, способны подавлять развитие фитопатогенных микроорганизмов. Так, штамм *P. fluorescens*, секретирующий сидерофор гидроксаматного типа, показал высокую эффективность против гриба *Macrophomina phaseolina*, вызывающего арахисовую угольную гниль [171]; сидерофор катехолового типа, продуцируемый *P. syringae*, оказывал ингибирующее действие на прорастание спор и морфологию мицелия *Fusarium oxysporum* [172]; штаммы *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* за счет синтеза сидерофоров активно подавляли возбудителя бактериального вилта томатов [173].

Стоит отметить, что ингибирование фитопатогенов посредством сидерофоров не всегда происходит на конкурентной основе. Сидерофор энантио-пиохелин, продуцируемый штаммом *P. protegens* CS1, выделенным из филлосферы лимонного дерева, проявлял антагонистическую активность в тестах *in vitro* и в филлосфере лимона против патогена *Xanthomonas citri* subsp. *citri* [174]. Добавление железа и аскорбиновой кислоты показало, что механизмом наблюдаемой антимикробной активности являлась не конкуренция за железо, а окислительный стресс, вызванный образованием активных форм кислорода (АФК) из пиохелина. Действительно, аскорбиновая кислота была способна противодействовать антимикробной активности АФК, в то время как добавление железа почти не имело эффекта. Напротив, эксперименты с *P.*

orientalis F9 и мутантом, дефицитным по продукции сидерофора пиовердина, показали, что мутант все еще был способен ингибировать рост *E. amylovora*, трёх патогенов *P. syringae* и *P. ultimum* [175]. Это указывает на то, биоконтроль штаммом *P. orientalis* F9 осуществляется не за счет пиовердина, а других механизмов. Другая функция сидерофоров в филлосфере была продемонстрирована Руизом с соавторами [176]. Исследователи выявили, что сидерофоры пиовердин и энантио-пиохелин, синтезируемые штаммом *P. protegens*, были ответственны за его устойчивость к микотоксину фузариновой кислоте, продуцируемой патогенными грибами рода *Fusarium* и токсичной для растений и бактерий.

1.3.2.3. Продукция HCN

Синтез цианидов является еще одним способом, используемыми псевдомонадами в подавлении развития патогенов [177]. Количество и скорость образования псевдомонадами HCN может варьировать в зависимости от вида сельскохозяйственных культур, вероятно, из-за разницы в аминокислотном составе корневых экссудатов.

Предполагается наличие тесной взаимосвязи между активностью биоконтроля псевдомонад и их способностью продуцировать цианиды [178]. Раматте с соавторами обнаружили положительную корреляцию между синтезом HCN *in vitro* и защитой огурца против *Pythium ultimum* и томата против *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* [179].

Механизм антибиоза за счет HCN заключается в ингибировании концевой цитохром-С-оксидазы в дыхательной цепи [180] и связывании с металлоферментами [181]. Было показано, что HCN-продуцирующие псевдомонады способны индуцировать устойчивость к заболеваниям, вызываемым фитопатогенными грибами, например, *Thielaviopsis basicola* на табаке [182, 183], *Septoria tritici* и *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* на пшенице [184].

Первоначально считалось, что синтез цианидов способствует росту растений только за счет подавления патогенов. Однако недавно появились интересные данные исследования Риджавека и Лапанье [185], которые показывают, что цианид может косвенно увеличивать доступность фосфора за счет хелатирования металлов и разделения этих структур.

Однако, помимо своей полезной роли в защите растений от болезней, бактериальный HCN может оказывать и вредное воздействие на некоторые растения [186, 187]. Как известно, цианиды псевдомонад негативно влияют на рост салата и фасоли [188]. В исследовании, проведенном Кремером и Суисси [189], штаммы, продуцирующие HCN, предложены к использованию для биологической борьбы с сорняками.

1.3.2.4. Синтез летучих органических соединений

Еще одним из свойств PGPR является синтез вторичных метаболитов в виде летучих органических соединений (ЛОС), выполняющих важную роль в передаче сигналов между микроорганизмами и растениями [190].

Микробы производят разнообразные по химическому строению ЛОС, включая короткоцепочечные алифатические альдегиды, сложные эфиры, спирты, органические кислоты, простые эфиры, кетоны, соединения серы и углеводороды [191]. Эти соединения имеют высокое давление пара, низкую температуру кипения и низкую молекулярную массу (<300 Да), что позволяет им легко проникать через почвенные структуры [192]. Установлено, что на продукцию микробных ЛОС в почве влияют многие факторы, в том числе pH, доступная влага, температура, уровень кислорода и содержание питательных веществ в почве [190]. Фаза роста микроорганизма также влияет на синтез ЛОС.

Как было установлено, ЛОС способны повышать урожайность сельскохозяйственных культур за счет того, что являются прямым источником питательных веществ для растений, а также посредством индуцирования устойчивости к патогенам [193]. Исследования показывают, что микробные ЛОС могут косвенно влиять на развитие корней, секрецию гормонов и рост растений [192, 194]. Например, результаты исследования Санторо с соавторами показали, что ЛОС, синтезируемые *P. fluorescens*, влияют на биосинтез эфирных масел и повышенные параметры роста мяты перечной [193]. Помимо этого биоконтрольные функции различных видов *Pseudomonas* также связывают с антибактериальной активностью их ЛОС [192]. Было показано, что летучие соединения бензотиазол и 1-метилнафталин, продуцируемые *P. fluorescens* WR-1, обладают бактериостатическим действием против патогена томатов *Ralstonia solanacearum* [195].

Помимо рострегуляторных и биоконтрольных функций ЛОС бактерий способны смягчать действие абиотических факторов, например, повышать устойчивость к засолению или засухе. Так, было продемонстрировано, что активация системной устойчивости *A. thaliana* к засухе обеспечивалась 2R-3R-бутандиолом, выделяемым *P. chlororaphis* и влияющим на закрытие устьиц посредством летучего вещества, что значительно снижало испарение воды и способствовало накоплению воды в тканях растений [196].

1.3.2.5. Индукция системной устойчивости (ISR)

Колонизация растений некоторыми микроорганизмами может привести к индукции системной устойчивости и защите растений от различных патогенов. ISR генерируется в ответ на внешний стимул, который обеспечивает растениям защитный иммунитет. Механизмы ISR включают: (1) стимуляцию роста, (2) физиологическую толерантность, (3) усиление клеточной

стенки и (4) увеличение синтеза фитоалексинов, защитных ферментов, антиоксидантов, пролина, белков, связанных с патогенезом, отложение лигнина, модуляцию фенолов с антимикробными и антиоксидантными свойствами [197-200]. Показано, что флуоресцентный штамм *P. aeruginosa* также подавлял продукцию щавелевой кислоты, синтезируемой грибом *S. sclerotiorum*, при моно-инокуляции гороха или в консорциуме с другими микроорганизмами [201].

Эффект ISR обычно изучается в системе псевдомонада-патоген [202]. Вещества, способствующие ISR, частично совпадают с веществами, участвующими в микробном антагонизме, и включают сидерофоры, антибиотики, N-ацил-гомосериновые лактоны и летучие соединения. Было показано, что псевдобактин 358, продуцируемый *P. putida* WCS358, запускает ISR в томатах, в то время как мутант не проявлял данного свойства [203]. Снижение доступности железа для *P. fluorescens* WCS374 и WCS417 увеличивало подавление заболевания за счет запуска ISR сидерофорами, продуцируемыми этими штаммами [204]. Также PhI, продуцируемый *P. fluorescens* CHA0, запускал ISR против *Peronospora parasitica* [205]. Было обнаружено, что фитогормоны штамма *P. fluorescens* WCS417r жасмонат и этилен используются в качестве сигналов для запуска ISR [206]. Сарванакумар и Кавино [207] наблюдали увеличение содержания пролина в маше, инокулированном *P. fluorescens* Pf1.

1.4. Практическое применение псевдомонад

Из-за простых требований к условиям роста и составу питательных сред, способности продуцировать и разлагать ряд соединений, псевдомонады считаются многообещающими микроорганизмами для различных биотехнологических применений. Некоторые псевдомонады способны продуцировать биосурфактанты и полигидроксиалканоаты, характеризующиеся низкой токсичностью и способностью к биоразложению [208].

Псевдомонады также являются продуцентами различных ферментов, действующих как катализаторы определенных биохимических реакций. Высокая эффективность и специфичность облегчают внедрение ферментов в различные производственные процессы. Ферменты, продуцируемые псевдомонадами, могут использоваться при обработке кожи [209, 210], гидролизе масел для концентрирования производных жирных кислот для медицинских целей [211], производстве моноацилглицеринов и сложных эфиров гидрокоричной кислоты, используемых в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности [212, 213], производстве моющих средств [214] и биодизеля [215] и др.

Еще одно возможное применение псевдомонад – биоремедиация. Они способны удалять из окружающей среды различные токсичные загрязнители. Известно, что нефть изменяет физические и биохимические характеристики почвы. Нефть содержит множество компонентов,

включая алканы, ароматические углеводороды и смолы. Было показано, что некоторые штаммы р. *Pseudomonas* разлагают компоненты сырой нефти, автомобильных масел и дизельного топлива [216-218]. Кроме того, псевдомонады могут удалять тяжелые металлы, попадающие в окружающую среду с промышленными и бытовыми сточными водами. Исследования показали, что штаммы р. *Pseudomonas* способны метаболизировать такие металлы, как Cr, Cd, Mn, Fe, Cu, Ni, Pb [219-221]. Некоторые виды обладают огромным потенциалом детоксикации загрязнителей, содержащих пестициды и фенолы [220].

Псевдомонады с комплексом полезных свойств также находят своё применение в сельском хозяйстве. За счет прямых и опосредованных механизмов влияния на растения они могут действовать как биоудобрения, способствующие росту и развитию растений, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам и улучшению минерального питания [222-225]. Благодаря своим многогранным способам действия, включая колонизацию корней, положительное влияние на физиологию и рост растений, индукцию системной устойчивости, биоконтроль фитопатогенов, стимулирование роста растений, псевдомонады являются перспективными агентами для агропроизводства.

Применение бактериальных препаратов в сельском хозяйстве существенно повышает плодородие почвы и урожайность сельскохозяйственных культур [226-228]. Так, было показано, что обработка семян пшеницы штаммом *P. fluorescens*, являющимся активным продуцентом АЦК-дезаминазы, позволяет снизить использование азотных, фосфорных, калиевых и других химических удобрений: в вариантах использования биопрепаратов была зафиксирована более высокая урожайность и содержание белка в зерне [229]. Мавроди с соавторами [230] также продемонстрировали значительное увеличение длины побегов и массы корневой системы пшеницы при инокуляции семян штаммами псевдомонад 15D11R, 48B8R, 48G9R, Wood3R и Wayne1R. Применение *P. fluorescens* DR54 в полевых экспериментах значительно стимулировало рост кукурузы, а также увеличивало количество доступного фосфора в почве [231]. Исследование некоторых PGPR, включая *P. aeruginosa* AN Rai-27 и *P. putida* MA Rah-43, проведенное на томате, выявило положительное влияние на солюбилизацию фосфатов, продукцию ИУК, поглощение макроэлементов и повышенное содержание хлорофилла, что привело к лучшему развитию растений и урожайности [232].

В последние годы в научной литературе отмечается рост сообщений, демонстрирующих эффективность применения полезных микроорганизмов в качестве биопрепаратов [233]. Во всем мире активно растет спрос на микробные продукты из-за более высокого уровня экологической осведомленности, увеличения количества законов, защищающих окружающую среду, и постоянно растущего спроса на экологически чистые продукты питания. Во многих

странах есть организации, которые производят, продают и распространяют удобрения на основе микроорганизмов как в больших, так и в малых объёмах [234].

Однако биологические препараты продаются не так широко, как химические: к 2014 году рынок биоудобрений составлял лишь около 5% от общего рынка химических препаратов [235]. Это объясняется относительно невысокой стоимостью сельскохозяйственных химикатов, определенным недоверием к биопрепаратам из-за несогласованности результатов лабораторных и полевых экспериментов и др. Более того, в большинстве стран микробиологические продукты, как и химические, требуют длительных и дорогостоящих процедур регистрации. Соответственно, такие препараты в настоящее время используются лишь на небольшой части сельскохозяйственных земель во всем мире.

Тем не менее, рынок биоудобрений на основе PGPR ежегодно увеличивается [233]. Доминирующее положение занимают инокулянты для бобовых культур на основе азотфиксирующих ризобийных бактерий с долей рынка около 80%, за ними следуют биоудобрения-солубилизаторы фосфатов с долей 14% и 6% занимают биологические фунгициды, нематоды, инсектициды и препараты другого назначения [236-238].

Эффективность применения удобрений на основе ризобий не вызывает сомнений и практикуется уже много десятилетий, что значительно снижает потребность в минеральных удобрениях во многих странах [239].

В отличие от ризобийных инокулянтов, препараты на основе других PGPR, в том числе и штаммов р. *Pseudomonas*, используются реже и в гораздо меньших масштабах. По оценкам, ежегодно неризобийными препаратами обрабатывают не более нескольких тысяч гектаров [240]. Мировое производство сельскохозяйственных культур оценивается в 1,6 миллиарда гектаров [235], но, несмотря на десятилетия исследований, наблюдается очевидный недостаток проникновения на рынок и применения неризобийных биопрепаратов [240].

Тем не менее, по мнению специалистов, рынок микробиологических препаратов ожидает глобальный подъём из-за необходимости увеличения производства продуктов питания устойчивыми и экологичными методами [241]. Согласно прогнозам, доля рынка биопрепаратов достигнет 1,66 млрд долларов США к 2022 году и будет расти со среднегодовым темпом роста 13,2% с 2015 по 2022 год [235].

Благодаря своему многогранному действию на основе полезных штаммов псевдомонад создаются биопрепараты различного назначения: Р-мобилизаторы, фитостимуляторы, фунгициды и др. Основу препарата могут составлять как моно-штамм, так и консорциум различных видов. Так, в Аргентине зарегистрирован препарат Liquid PSA на основе *P. aurantiaca* [242], в Кубе – Fosforina (*P. fluorescens*) [243], в Швеции – препараты Amase

(*P. azotoformans*), Cedomon, Cedress, Cerall (*P. chlororaphis*) [244, 245]. В составе консорциума псевдомонады входят в большое количество коммерческих продуктов во многих странах, например, в Индии имеется продукт P sol B (*P. striata*, *Paenibacillus polymyxa*, *B. megaterium*) [245, 246], в Англии – Ammnite A 100 (*Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp.) [247], во Вьетнаме – BioGro (*P. fluorescens* / *putida*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*) [243], в Южной Африке – Organico (*Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp.) [248] и др.

В России на основе бактерий р. *Pseudomonas* выпускается несколько биофунгицидов. На основе штамма *P. aureofaciens* созданы такие продукты, как Псевдобактерин-2, Псевдобактерин-3, Елена, на основе *P. fluorescens* – Ризоплан и Планриз, проявляющие широкий спектр действия против фитопатогенных грибов и бактерий.

Таким образом, проведено и опубликовано большое количество исследований, демонстрирующих возможности и потенциал полезных псевдомонад, а также созданы различные коммерческие продукты на основе видов *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, успешно применяющиеся во многих странах. И чрезвычайно мало данных, касающихся изучения вида *P. asplenii*. В связи с этим, исследование малоизученного вида, а также аспекты его применения в сельском хозяйстве, представляют большой научный и практический интерес.

1.5. Заключение по обзору литературы

Одна из существенных задач 21 века – это разработка и внедрение устойчивых методов ведения сельского хозяйства. Одним из способов решения данной проблемы является использование эффективных биопрепаратов, применение которых быстро набирает обороты во всем мире. Эти микробные продукты уже успешно используются во многих странах, и ожидается, что их применение будет увеличиваться [249]. Растет количество исследований, направленных на выделение, идентификацию и анализ PGPR и создание на их основе биопрепаратов для различных культур [250-253]. Поэтому разумно ожидать, что вскоре будут предложены различные стратегии с использованием биопрепаратов для общего развития устойчивого растениеводства [254].

Рассмотренные в данной главе перспективы применения полезных бактерий р. *Pseudomonas* позволяют сделать вывод об их высоком потенциале в качестве продуцентов для создания сельскохозяйственных микробиологических препаратов различного назначения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Создание коллекции бактериальных штаммов

2.1.1. Выделение эндофитных бактерий

Для выделения эндофитных бактерий использовали поверхностно стерилизованные семена, указанные в таблице 1. В работе использовали следующий протокол стерилизации:

- 1) Промывание в проточной воде;
- 2) Промывание в проточной воде + ПАВ;
- 3) Замачивание в 70° этаноле – 2 мин;
- 4) Промывание в стерильной дистиллированной воде;
- 5) Замачивание в 5-15% в гипохлорите натрия – 7 мин;
- 6) Пятикратное промывание в стерильной дистиллированной воде;
- 7) Замачивание в 5-15% в гипохлорите натрия – 7 мин;
- 8) Пятикратное промывание в стерильной дистиллированной воде.

Эффективность метода стерилизации оценивали по отсутствию бактериального роста на питательной среде. Для этого поверхностно стерилизованные семена подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге, раскладывали на агаризованной среде R2A и культивировали в течение 2-х дней при 28°C.

Через 2 суток инкубирования отбирали поверхностно стерильные семена, переносили в ступку, добавляли 10 мл физиологического раствора и асептически разрушали пестиком. Из полученной суспензии готовили ряд последовательных разведений и поверхностно высевали на питательные среды ГМФ (таблица 2) и R2A (таблица 3), посеvy инкубировали в термостате при 28°C. Через 3 суток инкубирования посеvy просматривали, отмечали различные морфотипы, отсевали их на свежую питательную среду и выделяли в чистые культуры.

Таблица 1 – Образцы семян, используемых в исследовании

| Источник выделения | |
|---|---|
| Сосна обыкновенная (<i>Pinus sylvestris</i> L.) | Респ. Марий Эл, Бушковское участковое лесничество Сернурского лесничества |
| Ель гибридная (<i>Picea abies</i> (L.) Karst. × <i>Picea obovata</i> Ledeb.) | Респ. Марий Эл, Сернурское лесничество |
| Сахарная свёкла сорт Бугги | Воронежская область, пос. Рамонь |
| Сахарная свёкла сорт Вентура | Воронежская область, пос. Рамонь |
| Сахарная свёкла сорт Портланд | Воронежская область, пос. Рамонь |

Таблица 2 – Питательный агар на основе гидролизата говяжьего мяса ферментативного (ГМФ)

| Состав | Концентрация, г/л |
|-----------------------|-------------------|
| ГМФ-основа | 15 |
| NaCl | 9 |
| Агар | 18 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |

Таблица 3 – Среда R2A

| Состав | Концентрация, г/л |
|---------------------------------|-------------------|
| Дрожжевой экстракт | 0,5 |
| Пептон | 0,5 |
| Гидролизат казеина | 0,5 |
| Глюкоза | 0,5 |
| Крахмал | 0,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,3 |
| MgSO ₄ | 0,024 |
| Пируват натрия | 0,3 |
| Агар | 18 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| pH=6-6,5 | |

2.1.2. Выделение комплекса эпифитных и эндофитных бактерий

Для выделения комплекса эпифитной и эндофитной микрофлоры использовали вегетативные части (листья) субтропических растений, указанных в таблице 4.

Таблица 4 – Образцы листьев, используемых в исследовании

| Источник выделения | |
|---|-----------------------------|
| Азими́на (<i>Asimina triloba</i> (L.) Dunal) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Грейпфрут сорт Гульрибский (<i>Citrus paradisi</i> Macfad.) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Грейпфрут сорт Юбилейный (<i>Citrus paradisi</i> Macfad.) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Киви (р. <i>Actinidia</i>) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Мандарин сорт Ковано-Васе (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Персик обыкновенный сорт Колинс (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Персик обыкновенный сортоформа Славный (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Фейхоа (<i>Acca sellowiana</i> (O. Berg) Burret) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Фундук сорт Черкесский (<i>Corylus avellana</i> L.) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Хурма сорт Джиро (р. <i>Diospyros</i>) | Краснодарский край, г. Сочи |

Лист изучаемого растения переносили в стерильную ступку и асептически разрушали с помощью стерильного пестика, добавляли 10 мл стерильной водопроводной воды и готовили ряд последовательных разведений. Из полученных разведений проводили поверхностный посев

на среду R2A. Посевы инкубировали при 28°C в течение 4 суток, после чего отмечали различные морфотипы, отсевали их на свежую питательную среду и выделяли в чистые культуры.

2.1.3. Выделение ризосферных бактерий

Для выделения ризосферных бактерий использовали образцы почв, отобранных с корней различных растений, указанных в таблице 5.

Таблица 5 – Образцы ризосферной почвы, используемой в исследовании

| Источник выделения | |
|--|---|
| Азими́на (<i>Asimina triloba</i> (L.) Dunal) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Бамбук обыкновенный (<i>Bambusa vulgaris</i> Schrad. ex J.C.Wendl.) | Тайланд, о. Пхукет |
| Горчица белая (<i>Sinapis alba</i> L.) | Московская область, г. Щелково |
| Пальма (сем. <i>Palmaceae</i>) | Тайланд, о. Пхукет |
| Пшеница мягкая озимая (<i>Triticum aestivum</i> L.) | Краснодарский край, с. Отрадо-Кубанское |
| Фундук сорт Черкесский (<i>Corylus avellana</i> L.) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Чай сорт Г-79-79 (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Чай сорт Грузинский №15 (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Чай сорт Кимынь селекционный (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Чай сорт Колхида (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) | Краснодарский край, г. Сочи |
| Чай сорт Кубанский (<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze) | Краснодарский край, г. Сочи |

Для анализа готовили навески анализируемой почвы (10 г), помещали их в конические колбы с 90 мл стерильного физиологического раствора и ставили на качалку (30 мин при 200 об/мин). После этого проводили ряд последовательных разведений, из которых проводили поверхностный посев на питательные среды ГМФ, R2A и Эшби (таблица 6). Для выделения спорообразующих бактерий прогревали почвенные суспензии при 80°C в течение 20 мин и поверхностно рассеивали на указанные питательные среды. Посевы инкубировали при 28°C в течение 4-5 суток, после чего отмечали различные морфотипы, отсевали их на свежую питательную среду и выделяли в чистые культуры.

Таблица 6 – Среда Эшби

| Состав | Концентрация, г/л |
|--------------------------------------|-------------------|
| Маннит / сахароза | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,2 |
| NaCl | 0,2 |
| K ₂ SO ₄ | 0,1 |

| | |
|--|---------|
| CaCO ₃ | 5 |
| Агар | 18 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| рН до добавления CaCO ₃ 7,0-7,5 | |

2.1.4. Выделение ризосферных бактерий методом активной колонизации корней

Выделение ризосферных бактерий методом активной колонизации корней проводили на семенах сосны обыкновенной. Пробы дерново-подзолистых почв были взяты из-под сосны и ели, растущих на территории возле Павловского государственного музея-заповедника, Санкт-Петербург (таблица 7).

Таблица 7 – Образцы ризосферной почвы, используемой в исследовании

| Источник выделения | |
|---|------------------------------|
| Ель европейская (<i>Picea abies</i> (L.) H.Karst.) | Санкт-Петербург, г. Павловск |
| Сосна обыкновенная (<i>Pinus sylvestris</i> L.) | Санкт-Петербург, г. Павловск |

Поверхностно стерилизованные семена сосны проращивались на стерильных фильтровальных дисках, смоченных водой, в течение 2 недель. Стерильные проростки раскладывали в чашки Петри с 0,6%-ной агарозой, а вокруг корня – комочки почвы на расстоянии 1-3 см таким образом, чтобы почва не касалась корней. Посевы инкубировали в термостате при 28°C в течение 24 ч.

Через 24 ч корень проростка отрезали, асептически разрушали в стерильной ступке с добавлением 10 мл стерильного физиологического раствора, делали ряд последовательных разведений и поверхностно высевали на среду ГМФ. Посевы инкубировали в термостате при 28°C в течение 3 суток, после чего отмечали различные морфотипы, отсеивали их на свежую питательную среду и выделяли в чистые культуры

2.2. Анализ фунгицидной активности бактерий из созданной коллекции

Фунгицидную активность исследуемых штаммов проверяли методом диффузии в двухслойный агар. Предварительно разливали по чашкам Петри по 20 мл стерильной картофельно-сахарозной среды (КСА) с 2% агара (таблица 8). Для анализа готовили суспензию спор и мицелия грибов. Для этого 1/8 часть агара, засеянного грибом, переносили в стерильную чашку Петри, добавляли 10 мл стерильной воды и смывали конидии и мицелий стерильным шпателем. После чего добавляли 20 мкл полученной суспензии в 4,98 мл остуженной до 45°C среды КСА с 1,2% агара, тщательно перемешивали и разливали вторым слоем. Через 1 час в агаре стерильным пробойником делали «лунки», в которые вносили по 100 мкл суспензий штаммов, выращенных на жидкой среде R2A. Посевы культивировали 4-10 суток (в

зависимости от скорости роста вида гриба) при температуре 20°C, после чего регистрировали наличие или отсутствие зон угнетения роста фитопатогенов.

Таблица 8 – Картофельно-сахарозный агар (КСА)

| Состав | Концентрация, г/л |
|-----------------------|-------------------|
| Картофель | 200 |
| Сахароза | 16 |
| Агар | 20 / 12 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |

2.3. Анализ бактерицидной активности бактерий из созданной коллекции

Бактерицидную активность исследуемых штаммов проверяли методом диффузии в двухслойный агар. Предварительно разливали по чашкам Петри по 20 мл стерильной картофельно-сахарозной среды (КСА) с 2% агара. Для анализа готовили суспензию бактериальных фитопатогенов (культивирование на жидком бульоне ГМФ в шейкере-инкубаторе при постоянном перемешивании 220 об/мин и температуре 30°C в течение 24 ч). После чего добавляли 1 мл полученной суспензии в 4 мл остуженной до 45°C среды КСА с 1,2% агара, тщательно перемешивали и разливали вторым слоем. Через 1 час в агаре стерильным пробойником делали «лунки», в которые вносили по 100 мкл суспензий штаммов, выращенных на жидкой среде R2A. Посевы культивировали 24 ч при температуре 30°C, после чего регистрировали наличие или отсутствие зон угнетения роста фитопатогена.

2.4. Анализ синтеза ИУК

Для выявления способности к продуцированию ИУК изучаемые штаммы культивировали на жидкой питательной среде R2A с внесением 500 мг/л L-триптофана в качестве предшественника в биосинтезе ауксинов. Бактерии культивировали стационарно при 28°C в течение 3 суток. Затем 1 мл культуры вносили в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали 2 мин при 14000 об/мин. 0,5 мл супернатанта вносили в новые пробирки и добавляли 0,5 мл реактива Сальковского, содержащего 0,05M FeCl₃×6H₂O в 61,5% HClO₄ [255, 256]. Пробирки инкубировали 10 мин при комнатной температуре. По интенсивности изменения окрашивания от бледно-розового до малинового судили об уровне продукции ИУК и ее производных исследуемыми штаммами бактерий.

Для количественного определения строили калибровочную кривую со стандартными растворами индолилуксусной кислоты (10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл).

2.5. Анализ синтеза сидерофоров

Способность к синтезу сидерофоров изучали на CAS-агаре [257] (таблица 9), на поверхность которого высевали 5 мкл ночной бактериальной культуры, выращенной на среде King's B (таблица 10). Посевы инкубировали 1 сутки при 28°C. О наличии сидерофорной активности судили по появлению красной, жёлтой или оранжевой окраски вокруг бактериальной колонии.

Для количественного определения сидерофоров [258] использовали жидкую питательную среду SM (таблица 11), на которой выращивали изучаемый штамм при температуре 30°C и перемешивании 220 об/мин в течение 24 ч. После периода инкубации культуральную жидкость центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин. Бесклеточный супернатант смешивали с реактивом CAS в соотношении 1:1 и измеряли оптическую плотность при длине волны 630 нм (A_o). Контролем служила исходная питательная среда SM, смешанная с реактивом CAS (A_k). Содержание сидерофоров определяли по следующей формуле:

$$C = \frac{A_k - A_o}{A_k} \times 100, \quad \%$$

Таблица 9 – CAS-агар

| Раствор 1 | |
|--|-----------|
| 1) 0,06 г хромазуrol S + 50 мл деионизованной воды | |
| 2) 0,0027 г FeCl ₃ ×6H ₂ O + 10 мл 10 мМ HCl | |
| 3) 0,073 г HDTMA + 40 мл деионизованной воды | |
| Смешать раствор 1 и 9 мл раствора 2, влить в раствор 3 | |
| Стерилизация при 0,5 атм 30 мин | |
| Раствор 2 | |
| KH ₂ PO ₄ | 0,3 г |
| NaCl | 0,5 г |
| NH ₄ Cl | 1 г |
| Деионизованная вода | 750 мл |
| PIPES | 30,24 г |
| Довести pH до 6,8 (50% KOH), довести объём до 800 мл | |
| Добавить 15 г агара | |
| Стерилизация при 1 атм 15 мин | |
| Раствор 3 | |
| Деионизованная вода | 70 мл |
| Глюкоза | 2 г |
| Маннит | 2 г |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,493 г |
| CaCl ₂ | 0,011 г |
| MnSO ₄ ×5H ₂ O | 0,00167 г |
| H ₃ BO ₃ | 0,0014 г |
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 0,0004 г |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | 0,0012 г |
| NaMoO ₄ ×2H ₂ O | 0,001 г |
| Стерилизация при 1 атм 15 мин | |

| |
|--|
| Раствор 4 |
| 30 мл 10% (w/v) казаминовых кислот Стерилизация фильтрованием через мембранный фильтр |
| Приготовление агара |
| 800 мл раствора 2 + 70 мл раствора 3 + 30 мл раствора 4 + 100 мл раствора 1 |

Таблица 10 – Среда King's B

| Состав | Концентрация, г/л |
|--------------------------------------|-------------------|
| Пептон | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,5 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 1,5 |
| Агар | 20 |

Таблица 11 – Среда SM

| Состав | Концентрация, г/л |
|---|-------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 6 |
| KH ₂ PO ₄ | 3 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,2 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 |
| Янтарная кислота | 4 |
| pH=7,0 | |

2.6. Идентификация бактериальных штаммов

Видовую идентификацию наиболее перспективных бактериальных штаммов проводили методом секвенирования переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, на автоматическом секвенаторе AE3000¹. Последовательности были выровнены с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank. Секвенсы обрабатывали при помощи компьютерной программы Ribosomal Database Project II, предназначенной для определения родства микроорганизмов и построения филогенетических деревьев.

2.7. Анализ ростстимулирующей активности

Ростстимулирующую активность штамма *P. asplenii* 11RW анализировали на семенах кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта «Данский» в условиях *in vitro*. Для этого семена замачивали на 30 минут в 10 мл рабочих растворах с титром жизнеспособных клеток 10⁴-10⁸ КОЕ/мл, контрольный вариант замачивали в 10 мл стерильной воды. Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 6 мл стерильной воды, в течение 5 суток, после чего у проростков измеряли длину корня и сравнивали с контрольным значением.

¹ Видовая идентификация выполнена в Национальном биоресурсном центре Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (БРЦ ВКПМ) НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

Ростстимулирующую активность в микровегетационных опытах анализировали на семенах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Дарья, ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Таловский, кукурузы (*Zea mays* L.) гибридов Симпатия и Утренняя песня. Семена обрабатывали рабочими растворами бактериальных суспензий с исходным титром 10^9 КОЕ/мл (расход – 1 л/т, расход рабочей жидкости – 10 л/т) и высевали в горшки, заполненных торфогрунтом. Повторность 4-кратная. В контрольном варианте семена обрабатывали дистиллированной водой. Семена выращивали при температуре 24°C и 16/8-часовом периоде освещения в течение 36-41 суток, в течение которых фиксировали всхожесть, динамику изменения роста растений, а по окончании опыта длину корневой системы, сухую и сырую биомассу и сравнивали с контрольными значениями.

2.8. Анализ вирулентности, токсичности, токсигенности, диссеминации

Патогенность штамма *P. asplenii* 11RW определяли по показателям вирулентности, токсичности, токсигенности, диссеминации².

Вирулентность штамма изучали при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении суспензии клеток в физиологическом растворе. Белым крысам и белым мышам внутрибрюшинно вводили по 10^6 , 10^7 , 10^8 ; внутрижелудочно – по 10^7 , 10^8 и 10^9 клеток на животное. Контрольным животным вводили физиологический раствор. В опыте использовали по 6 животных на дозу при каждом введении. Период наблюдения – 15 суток.

Для изучения диссеминации через 30 суток после внутрижелудочного и внутрибрюшинного введения белым мышам клеточной суспензии штамма в тех же дозах, что при изучении вирулентности, делали посев методом отпечатков срезов внутренних органов животных (сердца, легких, печени, почек и селезенки) на питательную среду ГМФ.

При изучении токсичности взвесь клеток штамма нагревали при 80°C в течение 30 мин. Прогретую суспензию внутрибрюшинно вводили мышам по 10^7 , 10^8 и 10^9 клеток на животное (по 6 особей на дозу). Контрольным животным вводили физиологический раствор. Период наблюдения – 15 суток.

Токсигенность изучали на беспородных белых мышах при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении фильтратов 3- и 7-суточных культуральных жидкостей. Фильтрат 3-суточной культуральной жидкости вводили внутрижелудочно в 3-х дозах при максимальной 2,1 мл; внутрибрюшинно – в 3-х дозах при максимальной 1,6 мл. Фильтрат 7-суточной культуральной жидкости – внутрижелудочно в 3-х дозах, максимальная 1,9 мл; внутрибрюшинно – в 3-х дозах, максимальная 1,4 мл. Когда вводимый объем превышал 1,0 мл,

² Изучение патогенности штамма проведено в.н.с., к.б.н. Успенской С.Н. в НИЦ ТБП – филиале ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России

дозу делили пополам и вводили в 2 приема с интервалом в 4 часа. Контрольным животным вводили стерильную питательную среду в таких же объемах. В опыте использовали по 6 животных на дозу при каждом введении. Период наблюдения – 5 суток.

2.9. Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств

Культурально-морфологические свойства штамма *P. asplenii* 11RW изучали с помощью общепринятых микробиологических методов при культивировании штамма на средах R2A и ГМФ с фиксированием размера, цвета, поверхности, края колоний и последующим микроскопированием окрашенных препаратов по Граму с помощью микроскопа Primo Star (Zeiss, Германия).

Для определения физиологического оптимума штамм выращивали при pH от 4,0-9,0 с шагом 0,5 единиц, для определения оптимума температуры штамм выращивали в диапазоне от 4 до 40°C, для определения предельного содержания NaCl – при 0-10% NaCl. Штамм культивировали в жидкой среде King's B на термостатируемой качалке Ecotron (Infors HT, Швейцария) при 220 об/мин. Прирост биомассы оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости при $\lambda=600$ нм (ОП₆₀₀) через 3 суток.

Протеолитическую активность штамма оценивали по разжижению желатины после укола столбиков среды (таблица 12). Посевы культивировали при комнатной температуре в течение 7 суток.

Амилолитическую активность проверяли на среде с крахмалом (таблица 13), на которую высевали изучаемый штамм и инкубировали в течение 3 суток при 28°C. Гидролиз крахмала оценивали после обработки агаровой пластины раствором Люголя.

Липолитическую активность исследовали на среде, содержащей Твин-80 (таблица 14), на которую высевали изучаемый штамм и инкубировали в течение 3 суток при 28°C. На наличие липазы указывало образование вокруг лунок с внесением анализируемой суспензии зоны кальциевых солей жирных кислот, освобождённых из Твина.

Другие ферментативные активности определяли с помощью набора реагентов «Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов» (ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России).

Таблица 12 – Среда для изучения протеолиза желатина

| Состав | Концентрация, г/л |
|----------------------|-------------------|
| Мясопептонный бульон | 100 мл |
| Желатина | 10-15 |

Таблица 13 – Среда для изучения амилолитической активности

| Состав | Концентрация, г/л |
|---------------------------------|-------------------|
| Пептон | 10 |
| K ₂ HPO ₄ | 5 |
| Растворимый крахмал | 2 |
| Агар | 15 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| pH=6,8-7,0 | |

Таблица 14 – Среда для изучения липолитической активности

| Состав | Концентрация, г/л |
|-------------------------------------|-------------------|
| Твин-80 | 10 |
| Пептон | 10 |
| NaCl | 5 |
| CaCl ₂ ×H ₂ O | 0,1 |
| Агар | 20 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| pH=7,4 | |

2.10. Анализ спектра фунгицидного действия штамма *P. asplenii* 11RW

Спектр фунгицидного действия штамма *P. asplenii* 11RW изучали 3-мя методами.

Первая часть опытов заложена по методу диффузии в двухслойный агар (пункт 2.2).

Во второй части опыта использовали стерильную картофельно-глюкозную среду (таблица 15), в которую вводили 0,1% суспензии анализируемого штамма, тщательно перемешивали и разливали по 20 мл в чашки Петри. После застывания на поверхность среды раскладывали блок фитопатогенного гриба. Посевы культивировали при 25°C в течение 10 суток, в течение которых фиксировали диаметр разрастания мицелия.

В третьей части использовали метод встречных культур: в чашки Петри с 20 мл КСА на один край высевали штрихом штамм *P. asplenii* 11RW, на противоположный – переносили блок фитопатогена. Посевы культивировали при 25°C в течение 7 суток, после чего фиксировали степень разрастания мицелия гриба.

Таблица 15 – Картофельно-глюкозный агар (КГА)

| Состав | Концентрация, г/л |
|-----------------------|-------------------|
| Картофель | 200 |
| Глюкоза | 16 |
| Агар | 18 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |

2.11. Изучение действия летучих соединений штамма на рост мицелия фитопатогенов

Для анализа эффекта летучих соединений использовали методику, описанную Гарбевой с соавторами [259]. Анализируемая бактериальная суспензия вносилась в стерильный картофельно-сахарозный агар (40-45°C) и разливалась по 20 мл на дно чашек Петри. В качестве контроля выступал КСА без внесения бактериальной суспензии. На крышки чашек разливали по 12 мл стерильного водного агара, в центр которых помещали блоки агара диаметром 1 см, вырезанные из посевов фитопатогенных грибов. Чашки Петри закрывали, стык заклеивали парафильмом. Посевы инкубировали при 25°C в течение 4-7 суток, после чего оценивали влияние летучих экзометаболитов на развитие гриба по измерению диаметра колонии и сравнению с контрольными значениями.

2.12. Изучение действия летучих соединений штамма на прорастание конидий

Для анализа действия летучих соединений использовали модифицированную методику Гарбевой с соавт. [259], опыт проводили в двухсекционных чашках Петри. Анализируемая бактериальная суспензия вносилась в стерильную растопленную среду ГМФ (40-45°C) и разливалась по 10 мл в одну секцию чашек. В качестве контроля выступал ГМФ без внесения бактериальной суспензии. Во вторую секцию разливали 10 мл стерильного водного агара, на поверхность которого переносили конидии фитопатогенов. Чашки Петри закрывали, стык заклеивали парафильмом. Посевы инкубировали при 25°C в течение 7 суток, после чего оценивали влияние летучих экзометаболитов на прорастание спор грибов путем микроскопирования посевов и подсчета проросших, непроросших и аномальных конидий.

2.13. Изучение ростстимулирующего действия летучих соединений штамма

В работе использовали семена табака (*Nicotiana tabacum* L.), поверхностно стерилизованные по следующему протоколу:

- 1) Замачивание семян в эппендорфе с 0,75 мл 5-15% гипохлорита натрия – 4 мин;
- 2) Добавление 0,75 мл стерильной дистиллированной воды, перемешать, слить;
- 3) Промывание в стерильной дистиллированной воде – 5-кратно;
- 4) Замачивание в 1 мл 70° этанола – 10 сек;
- 5) Промывание в стерильной дистиллированной воде – 5-кратно.

В первой части опыта использовали двухсекционные чашки Петри, в одну половину которой разливали 10 мл среды Мурасиге-Скуга с половинной долей компонентов (1/2 МС) (таблица 16), во вторую – 10 мл среды R2A. На поверхность 1/2 МС выкладывали по 3 наклонившихся поверхностно стерильных семени табака сорта Трапезонд-92 и Вирджиния 202, на поверхность R2A – штрихом высевали штамм *P. asplenii* 11RW. В качестве контроля

выступали чашки Петри без посева бактерии. Чашки Петри закрывали, стык заклеивали парафильмом. Посевы инкубировали при 16/8-часовом световом дне в течение 30 суток, после чего извлекали и взвешивали проростки и сравнивали с контрольными значениями.

Во второй части опыта использовали стерильный вермикулит (автоклавирование при 1 атм 30 мин), который увлажняли стерильной дистиллированной водой. Пластиковые стаканы объемом 200 мл с 3-мя отверстиями на дне заполняли по 65 г увлажненного субстрата, в который высевали по 3 поверхностно стерильных семян табака сорта Трапезонд-92. В стерильные стеклянные стаканы объемом 250 мл разливали по 15 мл среды R2A, на центр поверхности которой уколочным способом высевали штамм *P. asplenii* 11RW, в качестве контроля служила стерильная питательная среда. Пластиковые стаканы вставляли в стеклянные, стык заклеивали парафильмом, поверхность пластикового стакана герметично закрывали пленкой. Посевы инкубировали при 16/8-часовом световом дне в течение 30 суток, после чего извлекали и взвешивали проростки и сравнивали с контрольными значениями.

Таблица 16 – Среда Мурасиге-Скуга (1/2)

| Состав | Концентрация, г/л |
|---|-------------------|
| Сахароза | 15 |
| KNO ₃ | 0,95 |
| NH ₄ NO ₃ | 0,825 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,085 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,185 |
| MnSO ₄ ×5H ₂ O | 0,01205 |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | 0,0043 |
| H ₃ BO ₃ | 0,0031 |
| KI | 0,000415 |
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 0,0000125 |
| NaMoO ₄ ×2H ₂ O | 0,000125 |
| CoCl ₂ ×6H ₂ O | 0,0000125 |
| FeSO ₄ ×7H ₂ O | 0,00139 |
| Na ₂ -ЭДТА×2H ₂ O | 0,0189 |
| CaCl ₂ | 0,166 |
| Агар | 8 |

2.14. Изучение фосфатмобилизующей активности

Способность изучаемого штамма к мобилизации неорганических соединений фосфора оценивали на среде Пиковской (таблица 17). В качестве нерастворимого фосфата в опыте использовали Ca₃(PO₄)₂, который в качестве единственного источника фосфора добавляли в среду в концентрации 5 г/л. В чашки Петри разливали стерильную среду, стерильным пробойником делали лунки, в которые вносили по 100 мкл суспензии анализируемого штамма.

Посевы инкубировали 10 суток при температуре 28°C. По появлению прозрачных зон растворения фосфатов (гало) судили о фосфатмобилизующей активности штамма.

Таблица 17 – Среда Пиковской

| Состав | Концентрация, г/л |
|---|-------------------|
| Глюкоза | 10 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,5 |
| NaCl | 0,2 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,1 |
| KCl | 0,2 |
| Дрожжевой экстракт | 0,5 |
| MnSO ₄ ×H ₂ O | 0,002 |
| FeSO ₄ ×7H ₂ O | 0,002 |
| Агар | 15 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| pH=7,0 | |

2.15. Изучение продукции аммония

Исследуемый штамм высевали в 10 мл пептонной воды (таблица 18), культивировали в течение 4 суток при 30°C, после чего добавляли 0,5 мл реактива Несслера. Положительной реакцией считали появление желто-коричневой окраски раствора, свидетельствующей о продукции аммония.

Таблица 18 – Пептонная вода

| Состав | Концентрация, г/л |
|-----------------------|-------------------|
| Пептон | 10 |
| NaCl | 5 |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| pH=7,0 | |

2.16. Изучение колонизационных свойств штамма в гнобиотических системах

В работе использовали семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Скэнт-3».

Для посева в гнобиотические системы семена пшеницы стерилизовали по следующему протоколу:

- 1) Промывание семян в проточной воде + ПАВ (3-кратно);
- 2) Промывание в проточной воде – 30 мин;
- 3) Замачивание в 70% этаноле – 1 мин;
- 4) Промывание в стерильной дистиллированной воде (3-кратно);
- 5) Замачивание в стерильной дистиллированной воде – 5 мин;
- 6) Замачивание в 5% NaClO – 8 мин;

- 7) Промывание в стерильной дистиллированной воде (3-кратно);
- 8) Замачивание в стерильной дистиллированной воде – 8 мин;
- 9) Замачивание в 5% NaClO – 8 мин;
- 10) Промывание в стерильной дистиллированной воде (3-кратно);
- 11) Замачивание в стерильной дистиллированной воде – 8 мин;
- 12) Подсушивание семян на стерильной фильтровальной бумаге – 15 мин.

Для контроля качества поверхностной стерилизации семена раскладывали на поверхность ГМФ-агара и культивировали в термостате при 28°C в течение 2 суток. После срока культивирования отбирали поверхностно стерильные семена, не имеющие бактериального обрастания.

Для инокуляции семян готовили суточную культуру исследуемого штамма (культивирование на жидкой среде R2A при 220 об/мин и 30°C). 1 мл суспензии центрифугировали (13000 об/мин, 5 мин), промывали стерильным раствором PNS (таблица 19, 20) и готовили рабочие растворы (10 мл) с содержанием живых клеток 10^7 КОЕ/мл. В качестве контроля использовали стерильную дистиллированную воду. Поверхностно стерильные и наклюнувшиеся семена (по 20 штук в варианте) помещали в подготовленные растворы. Семена замачивали в течение 20 мин с периодическим перемешиванием.

Для анализа готовили стерильные гнотобиотические системы, представляющие собой пробирки длиной 200 мм, диаметром 20 мм, заполненные стерильным кварцевым песком (размер фракций – 0,1-0,2 мм), увлажнённым раствором PNS. В каждую пробирку высевали по одному семени на глубину 5 мм. Посевы выращивали в течение 12 суток при 16/8-часовом световом режиме и освещении 10000 люкс.

На 7 и 12 сутки выращивания из каждого варианта извлекали по 4 проростка. У каждого проростка отсекали корень с налипшим к нему песком (область ризосферы). Корни помещали в колбу с 40 мл стерильной воды и мягко перемешивали в течение 30 мин. После чего полученную суспензию поверхностно высевали на питательную среду R2A.

Для количественного определения бактерий, колонизировавших ризоплану и эндосферу (внутреннее пространство корневой системы проростков), отмытые корни переносили в ступки, гомогенизировали с 10 мл стерильной дистиллированной воды. Полученный гомогенат поверхностно высевали на питательную среду R2A. Все посевы культивировали 4 суток при температуре 28°C, после чего подсчитывали количество выросших колоний и определяли колонизационный потенциал исследуемого штамма.

Таблица 19 – Plant nutrient solution (PNS)

| Состав | Концентрация, г/л |
|--|-------------------|
| Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O | 1,18 |
| KNO ₃ | 0,51 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,49 |
| Раствор микроэлементов | 1 мл |
| Дистиллированная вода | 1000 мл |
| 100 mM KH ₂ PO ₄ | 10 мл |
| pH=5,8 | |

Таблица 20 – Раствор микроэлементов

| Состав | Концентрация, г/л |
|---|-------------------|
| KI | 0,00075 |
| H ₃ BO ₃ | 0,0003 |
| MnSO ₄ | 0,009 |
| ZnSO ₄ ×7H ₂ O | 0,002 |
| Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O | 0,0002 |
| CuSO ₄ ×5H ₂ O | 0,00002 |
| CoCl ₂ ×6H ₂ O | 0,000024 |

2.17. Изучение антагонистической активности штамма *in planta*

В опытах по изучению биоконтрольных функций изучаемого штамма использовали фитопатогенные грибы *F. culmorum* 63 и *F. culmorum* 30 и семена пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта «Боевчанка». Анализируемый штамм *P. asplenii* 11RW наращивали в шейкере-инкубаторе 2-е суток на жидкой среде King's B при температуре 30°C и перемешивании 220 об/мин.

Культуру *F. culmorum* 63 выращивали на среде КСА 7 суток до получения конидий, после чего готовили смыв спор: для этого 1/4 часть агара, засеянного грибом, переносили в стерильную чашку Петри, добавляли 10 мл стерильной воды и шпателем смывали конидии. Количество спор в полученной суспензии определяли методом подсчета клеток в Камере Горяева. Готовили фоновую суспензию с титром конидий 10⁴ КОЕ/мл. Семена пшеницы поверхностно стерилизовали (по протоколу, описанному в пункте 2.15), после чего замачивали в суспензии штамма *P. asplenii* 11RW с титром клеток 10⁷ КОЕ/мл в течение 30 мин и высевали в вегетационные сосуды с кварцевым песком (размер фракций – 0,1-0,2 мм), содержащем фитопатогенный фон в объёме 10%. Повторность – 3-кратная. Посевы культивировали 10 суток при 16/8-часовом световом режиме и освещении 10000 люкс, после чего выросшие растения извлекали, отмывали от песка и подсчитывали количество растений, пораженных корневой и прикорневой гнилью.

Культуру *F. culmorum* 30 выращивали на среде КСА 7 суток до получения конидий. Семена пшеницы поверхностно стерилизовали, после чего обрабатывали суспензией

анализируемого штамма (норма расхода 1 л/т, 2 л/т, 3 л/т; расход рабочей жидкости – 10 л/т). Семена проращивали в рулонах фильтровальной бумаги, создавая искусственное инфицирование. Для этого под каждое семя раскладывали кусочки мицелия размером 2×2 мм, вырезанные из посевов *F. culmorum* 30. Проростки выращивали 18 суток при 16/8-часовом световом режиме и освещении 10000 люкс, после чего извлекали из рулонов проростки, фиксировали всхожесть, зараженность, длину надземной части и корневой системы растений и сравнивали с контрольными значениями.

2.18. Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW

Культивирование штамма в колбах проводили на средах R2A, King's B, ГМФ, минеральной среде с мелассой (таблица 21), минеральной среде с глюкозой (таблица 22) в шейкере-инкубаторе при 30°C и 220 об/мин в течение 48 часов, после чего определяли оптическую плотность суспензий с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США) и титр жизнеспособных клеток методом последовательных разведений и посева на питательные среды.

Периодическое глубинное культивирование штамма проводили с использованием лабораторного ферментера Biostat A (Sartorius Stedim, Германия) с рабочим объемом 1 л и пилотного ферментера («Эй Пи Биосистемы», Москва) с рабочим объемом 12 л, оснащенных датчиками температуры, pH, концентрации растворенного кислорода с автоматической регулировкой контролируемых параметров и компьютерным управлением.

Для приготовления инокулята использовали ночные культуры штамма *P. asplenii* 11RW на скошенном агаре ГМФ, которыми засеивали питательные среды в колбах. Инокулят культивировали в шейкере-инкубаторе при 220 об/мин и 30°C в течение 16-18 ч. Проводили серию периодических культиваций с целью изучения роста штамма в периодической культуре, отбирали промежуточные и финальные пробы, микроскопировали и определяли оптическую плотность полученных культуральных жидкостей и титр жизнеспособных клеток методом последовательных разведений и посевом на агаризованную среду R2A.

Таблица 21 – Минеральная среда с мелассой

| Состав | Концентрация, г/л |
|--------------------------------|-------------------|
| Меласса | 30 |
| $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ | 7 |
| KH_2PO_4 | 3 |
| $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,1 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1,5 |
| $Na_3C_6H_5O_7 \times 5,5H_2O$ | 0,5 |
| Кукурузный экстракт | 2,5 |
| Водопродная вода | До 1000 мл |

Таблица 22 – Минеральная среда с глюкозой

| Состав | Концентрация, г/л |
|--|-------------------|
| Глюкоза | 30 |
| K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O | 0,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ ×7H ₂ O | 0,25 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10 |
| Водопроводная вода | До 1000 мл |

2.19. Создание стабильной композиции и хранение прототипа препарата

Для создания стабильного по хранению прототипа биопрепарата анализировали различные добавки: карбоксиметилцеллюлоза (СМС), родопол (ксантановая камедь), гуммиарабик (камедь акации), поливинилпирролидон К-15 (PVP), полиэтиленгликоль 6000 (PEG), сахараза, глюкоза, глицерин. Для создания различных образцов использовали культуру *P. asplenii* 11RW с титром 10⁹ КОЕ/мл, к которой добавляли анализируемые стабилизаторы и антиоксидант (аскорбиновую кислоту). Численность жизнеспособных клеток в различных вариантах смешивания определяли в течение 3-х лет хранения при температуре 4-6°С методом последовательных разведений и посева на среду R2A.

2.20. Изучение эффективности лабораторного образца препарата в сравнении с коммерческими препаратами

Была проанализирована фунгицидная активность лабораторного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в тестах *in vitro* в сравнении с некоторыми микробиологическими препаратами с жидкой препаративной формой. Антагонистическую активность проверяли против 4-х фитопатогенных грибов: *F. culmorum* 63, *F. oxysporum* F-55071, *A. alternata* 245 и *A. tenuissima* 481-101 методом диффузии в двухслойный агар (пункт 2.2).

Рострегуляторные свойства лабораторного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW были проанализированы в вегетационном опыте в сравнении с некоторыми коммерческими микробиологическими препаратами. В работе использовали семена яровой пшеницы сорта «Омская-36», которые обрабатывали по схеме, представленной в таблице 23. После обработки семена высевали в торфогрунт по 10 семян на вегетационный сосуд, повторность опыта 4-кратная. Посевы выращивали при температуре 24°С и 16/8-часовом периоде освещения в течение 41 суток, в течение которых фиксировали всхожесть, динамику изменения роста растений, длину корневой системы и биомассу.

Таблица 23 – Схема обработки семян

| Препарат | Расход препарат и рабочей жидкости |
|-------------------------|------------------------------------|
| Контроль | - |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 1 л / 10 л |
| Альбит, ТПС | 0,04 л / 10 л |
| Псевдобактерин-3 | 0,2 л / 10 л |
| Экстрасол | 1 л / 10 л |

2.21. Испытание биологической эффективности опытного образца препарата в полевых условиях

2.21.1. Испытание опытного образца препарата в защите яблони

Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в течение 3-х лет в системе защиты яблони от парши *Venturia inaequalis* (Ске.) Wint. (2018-2020 гг.), мучнистой росы *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) (Salm.) (2020 г.) и монилиальной плодовой гнили *Monilia fructigena* (Pers.) Honey (2020 г) в условиях Краснодарского края³.

В 2018 г эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в полевых условиях испытывали в центральной подзоне прикубанской зоны садоводства Краснодарского края (ОАО «Агроном» Динского района) на яблоне сорта Ренет Симиренко. Сорт позднего срока созревания, высоковосприимчивый к парше и средневосприимчивый к мучнистой росе. Площадь питания – 5х3 м², высота деревьев – 2,5-3,0 м, возраст сада – 18 лет. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки) и опытный (обработка опытным образцом). Величина опытного варианта – 4 га, контроль представлял собой отдельный участок двух рядов площадью 225 м². Листовую обработку проводили методом однократного опрыскивания с расходом препарата 4 л/га и рабочей жидкости – 1200 л/га в фазу развития культуры (по шкале ВВСН) – стадия 81, начало спелости плодов (сортоспецифическое посветление основной окраски).

В 2019 г опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в центральной подзоне прикубанской зоны садоводства Краснодарского края (АО «Виктория-92» Динского района) на яблоне сорта Ренет Симиренко. Площадь питания – 5х2,5 м², высота деревьев – 2,0-2,5 м, возраст сада – 19 лет. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки) и опытный вариант (обработка опытным образцом). Величина опытного варианта – 2 га, контроль представлял собой отдельный участок двух рядов площадью 250 м². Листовую обработку проводили методом однократного опрыскивания с расходом препарата 4 л/га и рабочей жидкости – 1000 л/га в фазу развития культуры (по шкале ВВСН) – стадия 81, начало спелости плодов (сортоспецифическое посветление основной окраски).

³ Испытания проведены с.н.с., к.б.н. Якуба Г.В. (ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия») и руководителем группы по фунгицидам ООО «ИЦЗР», к.б.н. Кунгурцевой О.В.

В 2020 г опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в центральной подзоне прикубанской зоны садоводства Краснодарского края (Красноармейский район, с. Новомышастовская, АФ «Агрокомплекс») на яблоне сорта Ренет Симиренко. Площадь питания – 5х2 м², высота деревьев – 2,0-2,5 м, возраст сада – 10 лет. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки) и опытный (обработка опытным образцом). Величина опытного варианта – 2 га, контроль представлял собой отдельный участок четырех рядов, каждый длиной 20 м и общей площадью 300 м². Листовую обработку проводили методом трёхкратного опрыскивания с расходом препарата 2 и 4 л/га и рабочей жидкости – 1000 л/га в следующие фазы развития культуры (по шкале ВВСН):

- 1) Стадия 79, около 90 % сортотипичного размера плодов достигнуто;
- 2) Стадия 81, начало спелости плодов (сортоспецифическое посветление основной окраски);
- 3) Стадия 85, продвинутая спелость плодов, в возрастающей мере сортотипичная интенсивность окраски.

Дополнительно в 2020 г опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в ЗАО ОПХ «Центральное» Краснодарского края на яблоне сорта Голден Делишес, возраст сада – 11 лет. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки), опытный (обработка опытным образцом) и эталон сравнения (Ризоплан, Ж). Листовую обработку проводили методом четырёхкратного опрыскивания с расходом лабораторного образца препарата 1-3 л/га, эталона – 5 л/га и рабочей жидкости – 800-1000 л/га в следующие фазы развития культуры:

- 1) Цветение;
- 2) Плод;
- 3) Плод размером с орех лещины;
- 4) Плод размером с грецкий орех.

Испытания опытного образца препарата проводили согласно методическим указаниям [260-263].

Распространение болезни (R, %) учитывали по 100 молодым листьям с каждого из учетных деревьев.

Интенсивность развития болезни вычисляли по формуле:

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{N \cdot K} \cdot 100, \quad (1)$$

где R – развитие болезни, %;

$\sum(a \cdot b)$ – сумма произведений числа пораженных листьев на соответствующий балл;

N – число осмотренных листьев;

К – высший балл шкалы учёта.

Определение биологической эффективности препарата проводили по формуле Эббота:

$$Б.Э = \frac{R_k - R_o}{R_k} \cdot 100, \quad (2)$$

где Б.Э. – биологическая эффективность, %;

R_k – показатель поражения в контроле, %;

R_o – показатель поражения в опытном варианте, %.

2.21.2. Испытание опытного образца препарата в защите винограда

Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в течение 2-х лет в системе защиты винограда от серой гнили *Botrytis cinerea* Pers, милдью *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni и оидиума *Uncinula necator* (Schwein.) Burrill в условиях республики Крым и Краснодарского края.⁴

В 2019 г опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в полевых условиях в юго-западной зоне виноградарства Крыма (виноградные насаждения технического сорта Мерло, АО «Агрофирма «Черноморец», с. Угловое, Бахчисарайский район, Республика Крым) с целью определения биологической эффективности в контроле серой гнили винограда *Botrytis cinerea*.

В опыте размещали контрольный вариант (без обработки) и опытный (обработка опытным образцом). Листовую обработку проводили методом двукратного опрыскивания с расходом препарата 1 л/га и рабочей жидкости – 500-800 л/га в следующие фазы развития культуры (шкала ВВСН):

- 1) Стадия 85, размягчение ягод;
- 2) Стадия 89, перед уборкой.

Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против серой гнили также испытывали в 2020 г в Ялтинском районе республики Крым (ФГУП «ПАО «Массандра», филиал «Ливадия») на винограде сорта Каберне Совиньон 2005 г посадки. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки), опытный (обработка опытным образцом) и эталон сравнения (Ризоплан, Ж). Листовую обработку проводили методом четырёхкратного опрыскивания с расходом лабораторного образца 1-3 л/га, эталона – 4 л/га и рабочей жидкости – 800-1000 л/га в следующие фазы развития культуры:

- 1) Ягоды становятся мягкими;
- 2) Начало созревания: ягоды приобретают окраску;

⁴ Испытания проведены д.с.-х.н. Алейниковой Н.В. (ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН») и руководителем группы по фунгицидам ООО «ИЦЗР», к.б.н. Кунгурцевой О.В.

3) Период перед спелостью;

4) Период перед спелостью.

Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против милдью *Plasmopara viticola* испытывали в 2020 г в условиях Краснодарского края (Анапский район, СПК «1-й Винодельческий Кооператив») на винограде сорта Совиньон блан 2005 г посадки. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки), опытный (обработка опытным образцом) и эталон сравнения (Ризоплан). Листовую обработку проводили методом четырёхкратного опрыскивания с расходом лабораторного образца 1-3 л/га, эталона – 4 л/га и рабочей жидкости – 1000 л/га в следующие фазы развития культуры:

1) Ягоды размером с дробину;

2) Ягоды величиной с горошину, грозди висят;

3) Начало формирования гроздей;

4) Конец формирования гроздей.

Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против оидиума *Uncinula necator* испытывали в 2020 г в Темрюкском районе Краснодарского края (АО АФ «Южная») на винограде сорта Рислинг рейнский 2012 г посадки. В опыте размещали контрольный вариант (без обработки), опытный (обработка опытным образцом) и эталон сравнения (Ризоплан, Ж). Листовую обработку проводили методом четырёхкратного опрыскивания с расходом лабораторного образца 1-3 л/га, эталона – 4 л/га и рабочей жидкости – 800-1000 л/га в следующие фазы развития культуры:

1) Начало образования плода: завязи начинают увеличиваться, заканчивается «очистка ягод»;

2) Ягоды размером с дробину;

3) Ягоды величиной с горошину, грозди висят;

4) Начало формирования гроздей.

Исследования проводились по общепринятым в защите растений методикам. Учеты развития гнилей на модельных кустах каждой опытной делянки проводили согласно методическим указаниям [261].

Процент развития заболеваний рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{\sum(a \cdot b)}{N \cdot K} \cdot 100, \quad (3)$$

где R – развитие болезни, %;

$\sum (a \cdot b)$ – сумма произведений числа пораженных растений, органов (a) на соответствующий балл поражения (b);

N – общее число просмотренных гроздей;

K – высший балл шкалы учёта.

Определение биологической эффективности препарата проводили по формуле Эббота:

$$Б.Э = \frac{R_k - R_o}{R_k} \cdot 100, \quad (4)$$

где Б.Э. – биологическая эффективность, %;

R_k – развитие вредного объекта (повреждённость винограда) в контроле, %;

R_o – развитие вредного объекта (повреждённость винограда) в опытном варианте, %.

Полученные экспериментальные данные подвергали математической обработке общепринятыми методами с использованием анализа «Методика полевого опыта» [262] при помощи пакета анализа данных электронной таблицы Excel.

2.21.3. Испытание опытного образца препарата в защите пшеницы

Изучение эффективности опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW при обработке семян пшеницы был заложен в Кетовском районе Курганской области⁵.

Обработку семян проводили по следующей схеме:

1. Контроль (полусухая обработка водой);
2. Скарлет, МЭ (расход препарата – 0,4 л/т, рабочей жидкости – 10 л/т);
3. Лабораторный образец + Скарлет, МЭ (расход препаратов 1 л/т + 0,4 л/т, рабочей жидкости – 10 л/т).

Тип почвы в зоне закладки опытов – чернозем выщелоченный, легкосуглинистый, малогумусный. Количество фракций <0,01 мм в горизонте $A_{\text{пах}}$ составляет 28,9%; гумуса по Тюрину – 4,42%. В слое почвы 0-30 см содержание нитратного азота ($N-NO_3$) – 36,6 кг/га, плотность сложения почвы – 1,16 г/см³. Содержание подвижного фосфора – 39 мг/кг, обменного калия – 135 мг/кг. Актуальная кислотность (pH_{H_2O}) составила 5,30; ёмкость катионного обмена – 23,4 мг-экв./100 г почвы; степень насыщенности основаниями – 82,9%; рН солевой вытяжки – 5,7; общая пористость – 50,6%; влажность завядания (ВЗ) – 7,8%; мощность горизонтов ($A_{\text{пах}}+AB$) – 34 см.

Предшественник в опыте – яровая пшеница, стерневой фон. Посев семян пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Алабуга проводили стерневой сеялкой, норма высева 5 млн./га. Перед посевом внесена аммиачная селитра (60 кг/га). Уборка урожая – прямым комбайнированием с поделяночным учетом.

Интенсивность развития популяции возбудителя желтой пятнистости и септориоза на растениях пшеницы оценивали на листьях разных ярусов по фактически занятой грибницей или пятнами площади листьев. Для учетов применяли стандартную шкалы Гешеле и Джеймса [264].

⁵ Испытание проведено руководителем регионального центра фитосанитарного мониторинга почв агроландшафтов по Курганской области, д.с.-х.н. Евсеевым В.В.

Обследовали не менее 20-30 растений. Степень поражения определяли по стандартной формуле:

$$СП = (a \times b) / n, \quad (5)$$

где a – балл (или %) повреждения; b – число больных листьев с соответствующей им степенью поражения.

Методика оценки адаптивности пшеницы к корневой гнили проведена по А.П. Голощапову [265].

Развитие болезней рассчитывали по формуле:

$$P_6 = \sum ab / N, \quad (6)$$

где P_6 – развитие болезни, в баллах или %; $\sum ab$ – сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий балл или процент поражения (b).

Оценку элементов структуры урожая проводили в соответствии с рекомендациями [266] по пробным снопам, отобраным с учетных площадок (по каждому варианту опыта). Оценивали число растений, продуктивную кустистость, длину главного стебля, длину колоса, количество зерен в колосе, массу зерна с главного колоса.

2.22. Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Excel. Вычисляли средние значения и ошибки средних значений по каждому варианту проведенных экспериментов. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. ПОИСК НОВОГО ШТАММА-АНТАГОНИСТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

3.1.1. Выделение бактериальных штаммов

Материалом для выделения бактериальных штаммов служили различные образцы почв сельскохозяйственных угодий; ризосферные почвы, отобранные с корней древесных (ель, сосна, пальма, чай, фундук) и сельскохозяйственных растений (пшеница, горчица); семена (ель, сосна, свёкла) и вегетативные части различных субтропических культур (чай, персик, мандарин, грейпфрут, фейхоа, киви и др.).

Из различных объектов, указанных в разделах 2.1.1-2.1.4, в чистые культуры выделили более 350 культивируемых ризосферных, эпифитных и эндофитных бактериальных штаммов, ассоциированных с растениями. По результатам анализа выявили, что 43% от общего количества изолятов относятся к спорообразующим палочкам (р. *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*), 57% являются неспорообразующими культурами, представленные различными палочками, кокками и полиморфными видами (р. *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Empedobacter*, *Ensifer*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas* и др.).

3.1.2. Анализ бактериальной коллекции и изучение антагонистической и фитогормональной активностей

Для систематизации изолятов в созданной коллекции и отбора наиболее перспективных микроорганизмов провели анализ антагонистической активности в отношении 3-х штаммов фитопатогенных грибов (*Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichiodes* и *Fusarium culmorum*) и 3-х штаммов фитопатогенных бактерий (*Pectobacterium carotovorum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* и *Pseudomonas syringae*), а также анализ продукции ауксинподобных веществ. По результатам первичного скрининга было показано, что 54,1% от общего числа выделенных бактериальных штаммов способны подавлять развитие одного или нескольких использованных фитопатогенов и 54,5% способны к синтезу основного фитогормона типа ауксинов.

3.1.2.1. Анализ эндофитной микрофлоры

Полученные результаты позволили сделать вывод, что наибольшая доля штаммов-антагонистов была выявлена среди эндофитной микрофлоры. Так, 80% выделенных эндофитов

из семян сосны обыкновенной были способны активно подавлять не менее 4 фитопатогенных микроорганизмов; доля эндофитов-антагонистов семян ели гибридной составила 62,5% и семян сахарной свёклы – 53,3%.

Исключительными представителями эндофитной микрофлоры семян сосны обыкновенной явились бактерии рода *Bacillus*: 4 штамма *B. subtilis* 1EP, 2EP, 3EP, 4EP и 1 штамм *B. megaterium* 5EP. Микрофлора эндофитов семян ели гибридной была несколько разнообразнее и помимо представителей р. *Bacillus* включала штаммы *Pantoea vagans* 2ES и *Micrococcus* sp. 8ES. Все указанные бактерии обладали антагонистической активностью в разной степени, но не обладали способностью к продукции ИУК (за исключением штамма 2ES) [267].

Для эндофитной микрофлоры семян сахарной свёклы была выявлена сортоспецифичность. Так, в семенах гибрида Портланд в большей мере обнаруживались спорообразующие бактерии *Bacillus* spp. (6 штаммов) и 1 штамм *Pseudomonas* sp. При этом микрофлора семян сорта Вентура была представлена исключительно неспоровыми культурами (9 штаммов, представленные бактериями р. *Pseudomonas* и *Micrococcus* и некоторыми неидентифицированными видами). Наиболее бедными по составу оказались семена сорта Бугги: из внутренних тканей было выделено всего 2 неспорообразующих штамма р. *Micrococcus*. Среди выделенных эндофитов семян сахарной свёклы наиболее активными и ожидаемыми антагонистами явились спорообразующие штаммы из семян гибрида Портланд (*Bacillus* sp. 96.3 и *Bacillus* sp. 97.3), а продуцентами ИУК – неспоровые штаммы из семян сортов Вентура и Бугги (штаммы Б1, Б2, В1, В2, В5, В7).

3.1.2.2. Анализ комплекса эпифитной и эндофитной микрофлоры

Также активные продуценты антибиотических веществ были обнаружены и среди комплекса эпифитной и эндофитной микрофлоры субтропических культур (в частности, персика и чая). Так, из листа персика сорта Коллинз было выделено 2 штамма из общего числа (неидентифицированные бактерии Э1 и Э3), способных активно подавлять развитие 6 фитопатогенных грибов и бактерий, однако, не продуцирующих ИУК. В микрофлоре листа персика сортоформы Славный был также обнаружен активный антагонист (неидентифицированный штамм Э5), подавляющий развитие 5 фитопатогенов и также не способный к продукции анализируемого фитогормона [268].

3.1.2.3. Анализ ризосферной микрофлоры

Среди ризосферных микроорганизмов также были обнаружены штаммы с фунгицидной и бактерицидной активностью, однако в процентном отношении меньше, чем среди эндофитов:

например, доля антагонистов, выделенных из ризосферной почвы хвойных растений, составила 50% от общего числа, чайного куста – 37,7%.

Среди ризосферных микроорганизмов чайного куста было обнаружено значительное количество антагонистов. Так, было выделено 4 штамма, одновременно способных к продуцированию ауксинов и обладающих антимикробным действием в различной степени: неидентифицированный штамм P22, выделенный из ризосферной почвы с корней чая сорта Колхида, P25 – чая сорта Грузинский №15, P34 и P35 – чая сорта Кубанский. А также обнаружено несколько штаммов, обладающих исключительно антагонистической активностью: штаммы P18, P20, P22, выделенные из ризосферы чая сорта Колхида, P31 – чая сорта Грузинский №15, P41 – чая сорта Кимынь селекционный [269].

Методом активной колонизации корней проростков хвойных растений микрофлорой из ризосферной почвы, отобранной с корней сосны и ели, был выделен ряд бактериальных штаммов-антагонистов. Наиболее активными среди них явились *Bacillus subtilis* 1.1RP и *Bacillus subtilis* 1.2RP, подавляющие развитие как фитопатогенных грибов, так и бактерий, но не способных к продукции ИУК [270].

Среди ризосферной микрофлоры, выделенной из почвы с корней озимой пшеницы, доминирующими группами явились представители р. *Pseudomonas* (*P. asplenii* 11RW, *P. umsongensis* 12RW, *P. syringae* 17RW, *P. migulae* 18RW, *P. vancouverensis* 37RW) и р. *Bacillus* (*B. mojavensis* 1RW, 2 штамма *B. amyloliquefaciens* 2RW-1 и 2RW-2, 3 штамма *B. aryabhatai* 25RW, 26RW, 46RW). Помимо этого, среди выделенных бактерий были выделены *Paenibacillus mucilaginosus* 27RW, *Empedobacter haloabium* 34RW, *Phyllobacterium trifolii* 43RW, *Agrobacterium* sp. 48RW, *Azotobacter chroococcum* 49RW и ряд неидентифицированных изолятов. В данной группе бактерий было обнаружено наибольшее количество штаммов-продуцентов ИУК, их доля от общего числа составила 62,5%, а количество антагонистов – 26,5%.

Таблица 24 – Сводные результаты анализа коллекции и отбора наиболее активных штаммов

| Штамм | Источник выделения | ИУК | Фунгицидная активность по отношению к патогену | | | Бактерицидная активность по отношению к патогену | | |
|---|---|-----|--|------------------------|---------------------|--|---------------------------|------------------------|
| | | | <i>F. sporotrichioides</i> | <i>F. gramine-arum</i> | <i>F. culmo-rum</i> | <i>P. syrin-gae</i> | <i>Cl. michiga-nensis</i> | <i>P. caroto-vorum</i> |
| <i>Bacillus pumilus</i> 1D | Полевая почва | - | + | + | + | + | + | - |
| <i>Bacillus aryabhatai</i> BR4 | Ризосферная почва горчицы белой | + | + | + | + | + | - | - |
| BR12 | Ризосферная почва горчицы белой | - | - | +++ | - | + | - | - |
| BR17 | Ризосферная почва горчицы белой | + | - | ++ | - | - | - | ++ |
| <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 2RW-2 | Ризосферная почва озимой пшеницы | - | ++ | ++ | + | + | - | - |
| <i>Pseudomonas asplenii</i> 11RW | Ризосферная почва озимой пшеницы | + | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| P20 | Ризосферная почва чая сорта Колхида | - | + | + | +++ | - | - | + |
| P22 | Ризосферная почва чая сорта Колхида | + | + | + | + | - | - | + |
| P25 | Ризосферная почва чая сорта Грузинский №15 | + | +++ | ++ | ++ | + | - | + |
| P31 | Ризосферная почва чая сорта Грузинский №15 | - | ++ | ++ | ++ | - | - | ++ |
| P34 | Ризосферная почва чая сорта Кубанский | + | ++ | ++ | ++ | + | - | + |
| P41 | Ризосферная почва чая сорта Кимынь селекционный | - | +++ | ++ | +++ | ++ | - | - |
| P46 | Ризосферная почва фундука сорта Черкесский | + | +++ | ++ | ++ | - | - | + |
| P49 | Ризосферная почва азимины трёхлопастной | + | ++ | + | + | ++ | - | ++ |
| <i>Bacillus subtilis</i> 1.1RP | Ризосферная почва сосны обыкновенной | - | + | + | + | + | + | + |
| <i>Bacillus subtilis</i> 1.2RP | Ризосферная почва сосны обыкновенной | - | + | ++ | + | + | + | + |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| <i>Brevibacillus brevis</i> 12Б-1 | Ризосферная почва бамбука обыкновенного | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Bacillus</i> sp. 96.3 | Семена сахарной свёклы гибрида Портланд | - | - | + | + | ++ | - | ++ |
| <i>Bacillus</i> sp. 97.3 | Семена сахарной свёклы гибрида Портланд | - | - | ++ | + | +++ | + | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> 1ES | Семена ели гибридной | - | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>Bacillus</i> sp. 4ES | Семена ели гибридной | + | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> 1EP | Семена сосны обыкновенной | - | +++ | +++ | +++ | - | ++ | + |
| <i>Bacillus subtilis</i> 2EP | Семена сосны обыкновенной | - | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + |
| <i>Bacillus subtilis</i> 3EP | Семена сосны обыкновенной | - | +++ | +++ | +++ | - | +++ | + |
| <i>Bacillus subtilis</i> 4EP | Семена сосны обыкновенной | - | +++ | +++ | +++ | - | ++ | - |

Примечание: «-» – отсутствие антагонистической активности, «+» – зона ингибирования роста фитопатогена составляла 10-20 мм, «++» – зона составляла 21-35 мм, «+++» – зона составляла более 36 мм.

По результатам проведенной работы отобрали 25 микроорганизмов с наибольшим антимикробным действием (таблица 24), среди которых наиболее активным явился штамм 11RW, способный одновременно продуцировать ИУК и значительно ингибировать рост 6 изученных фитопатогенных грибов и бактерий. По результатам анализа сиквенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, а также биохимическим тестам отобранный штамм был отнесен к виду *Pseudomonas asplenii*. Культуру депонировали во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов по процедуре национального патентного депонирования под регистрационным номером В-13395.

После дальнейшего изучения хозяйственно-ценных свойств микроорганизмов из созданной коллекции дополнительно были идентифицированы и депонированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов следующие штаммы по процедуре национального патентного депонирования:

1) *Bacillus amyloliquefaciens* 2RW-2 под регистрационным номером В-13578 как продуцент антимикробных метаболитов, амилаз, протеаз, целлюлаз, эндо-1,4-β-глюканаз, выделенный из ризосферной почвы озимой пшеницы;

2) *Bacillus aryabhatai* BR4 под регистрационным номером В-13579 как фосфатмобилизатор и продуцент ИУК, выделенный из ризосферной почвы белой горчицы;

3) *Paenibacillus mucilaginosus* 27 под регистрационным номером В-13582 как калиймобилизатор, продуцент ИУК и антимикробных метаболитов, выделенный из ризосферной почвы озимой пшеницы.

Штаммы *B. aryabhatai* BR4 и *P. mucilaginosus* 27 вошли в состав микробиологического удобрения, предназначенного для улучшения азотно-фосфорно-калиевого питания растений, на который был получен патент РФ №2778562 «Смесь бактериальных штаммов, обладающая азотфиксирующей, фосфор- и калиймобилизующей активностью»;

4) *Bacillus mojaviensis* 1RW под регистрационным номером В-13580 как продуцент протео-, амило-, и целлюлозолитических ферментов, выделенный из ризосферной почвы озимой пшеницы. Указанный штамм вошел в состав микробиологического препарата, предназначенного для ускоренного разложения пожнивных остатков, на который был получен патент РФ №2752903 «Смесь бактериальных штаммов, обладающая целлюлозолитической и фунгицидной активностью».

Дополнительно 2 штамма были депонированы в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения:

1) *Bacillus subtilis* 1ES под регистрационным номером RCAM03132, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью против фитопатогенных микроорганизмов, штамм выделен из семян ели гибридной;

2) *Bacillus* sp. 4ES под регистрационным номером RCAM03134, обладающий фунгицидной и бактерицидной активностью против фитопатогенных микроорганизмов, штамм выделен из семян ели гибридной.

3.1.3. Фунгицидная активность потенциального штамма

Фунгицидную активность наиболее перспективного штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW подтверждали в сравнении с другими видами псевдомонад из созданной коллекции и продуцентами коммерческих биопрепаратов.

Антагонистическую активность проверяли на 7 штаммах фитопатогенных грибов 6 различных родов. Показали, что только анализируемый штамм *P. asplenii* 11RW способен активно подавлять все используемые тест-объекты в значительной степени. Только один из эталонов сравнения (*P. brassicacearum*) обладал фунгицидной активностью, однако степень подавления в сравнении со штаммом *P. asplenii* 11RW была гораздо ниже и проявлялась только в отношении 4-х фитопатогенов (таблица 25, рисунок 1).

Таблица 25 – Результаты сравнительного анализа фунгицидной активности

| Штамм | Средний диаметр зоны ингибирования роста фитопатогена, мм | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| | <i>Alternaria alternata</i> Д6 | <i>Bipolaris sorokiniana</i> 130 | <i>Cladosporium herbarum</i> | <i>Fusarium graminearum</i> 58918 | <i>Fusarium oxysporum</i> F-55071 | <i>Phoma betae</i> | <i>Phytophthora infestans</i> 40 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 49,3±0,2 | 52,3±1,0 | 57,8±2,1 | 35,6±0,9 | 37,4±0,3 | 44,9±0,2 | 30,8±0,2 |
| <i>P. aureofaciens</i> | 0 | 0 | 21,5±0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. brassicacearum</i> | 0 | 25,4±1,8 | 18,8±0,7 | 0 | 15,9±0,5 | 0 | 17,5±0,2 |
| <i>P. fluorescens</i> | 0 | 26,8±1,4 | 23,0±0,5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. migulae</i> 18RW | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. vancouverensis</i> 37RW | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |



Рисунок 1 – Результаты анализа фунгицидной активности штаммов псевдомонад против некоторых фитопатогенных грибов

3.1.4. Продукция сидерофоров потенциальным штаммом

Сидерофоры – низкомолекулярные вещества разной химической структуры, синтезируемые многими микроорганизмами, которые эффективно связывают железо.

Продукция бактериями сидерофоров положительно влияет на растения. В частности, было показано, что различные штаммы псевдомонад подавляют развитие почвенных фитопатогенов, и их биоконтрольные функции напрямую коррелируют с продукцией сидерофоров [165, 271]. PGPR подавляют пролиферацию фитопатогенных грибов, синтезируя сидерофоры и связывая большую часть Fe^{3+} . Фитопатогенные грибы тоже синтезируют сидерофоры, но они обычно обладают более низким сродством к железу, чем сидерофоры, синтезируемые PGPR-бактериями. Это позволяет последним одерживать верх в конкурентной борьбе с фитопатогенными грибами за имеющееся железо. Наряду с этим, сидерофоры защищают различные растения посредством индукции системной индуцированной резистентности, а также стимулируют рост за счет обеспечения растений дополнительным питанием.

Анализ на продукцию сидерофоров изучаемыми штаммами проводили с использованием общепринятого теста на CAS-агаре – агаризованной среде, содержащей комплекс Fe^{3+} , гексадецилтриметиламмоний бромид (HDTMA) и краситель хромазуrol S (CAS-реактив), исходная окраска которого меняется на красную, жёлтую или оранжевую при связывании хелатирующими агентами ионов Fe^{3+} в его составе. Фиксацию результатов проводили в течение 3 суток инкубации посевов бактерий на CAS-агар каждые 24 ч.

Показано, что рост всех анализируемых штаммов псевдомонад сопровождался появлением различных по размеру зон изменения цвета индикатора с синего на желтый, что указывало на образование сидерофоров, при этом наиболее активным продуцентом явился потенциальный перспективный штамм *P. asplenii* 11RW. Наибольший результат среди эталонов сравнения был достигнут штаммом *P. vancouverensis* 37RW, однако зона изменения окраски индикатора в данном варианте была в среднем в 2 раза меньше, чем штамма *P. asplenii* 11RW (таблица 26, рисунок 2).

Таблица 26 – Результаты анализа продукции сидерофоров

| Штамм | Средний диаметр зоны изменения окраски индикатора, мм | | |
|-------------------------------|---|----------|----------|
| | 24 ч | 48 ч | 72 ч |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 21,5±0 | 28,8±0,3 | 37,3±0,8 |
| <i>P. aureofaciens</i> | 14,3±0,8 | 16,8±1,3 | 19,5±0,5 |
| <i>P. brassicacearum</i> | 7,3±0,3 | 10,5±0 | 14,5±0,5 |
| <i>P. fluorescens</i> | 9,5±0 | 13,8±0,3 | 16,8±0,3 |
| <i>P. migulae</i> 18RW | 10,3±0,3 | 14,5±0 | 21,0±0 |
| <i>P. vancouverensis</i> 37RW | 11,0±0 | 17,3±0,3 | 22,5±0 |

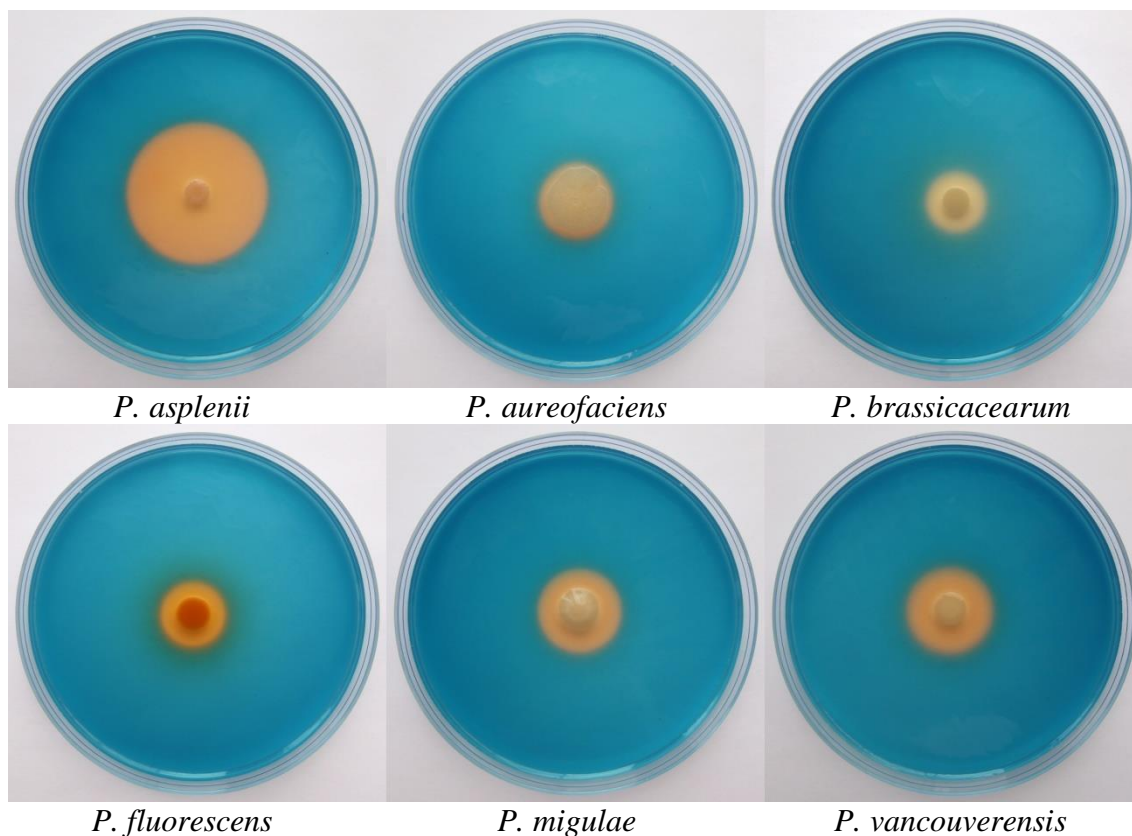


Рисунок 2 – Результаты анализа синтеза сидерофоров штаммами псевдомонад через 72 ч инкубирования на CAS-агаре

3.1.5. Ростстимулирующая активность потенциального штамма

Анализ ростстимулирующего действия потенциального штамма *P. asplenii* 11RW и эталонов сравнения проводили в микровегетационном опыте на семенах кукурузы гибрида «Утренняя песня». В опыте использовали бактериальные суспензии, выращенные на жидкой среде ГМФ до содержания жизнеспособных клеток на уровне 10^9 КОЕ/мл, которыми обрабатывали семена с расходом 1 л/т. Результаты представлены в таблицах 27 и 28.

Проведенное исследование не выявило проявления фитотоксического эффекта на исследуемой культуре, а также показало стимулирующее действие штамма *P. asplenii* 11RW на развитие кукурузы: в данном варианте наблюдалось увеличение всхожести семян и длины надземной части, а также биомассы растений. При этом подобного стимулирующего действия других видов псевдомонад выявлено не было.

Таблица 27 – Результаты анализа ростстимулирующей активности штаммов

| Штамм | Всхожесть, % | Средняя длина побегов, см | | Средняя длина корней, см |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------|----------|-----------------------------|
| | | 14 сутки | 36 сутки | 36 сутки |
| Контроль | 27 | 25,6±2,1 | 39,4±2,7 | 30,5±3,6 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 47 | 32,4±2,0 | 47,1±1,8 | 30,4±3,3 |
| <i>P. aureofaciens</i> | 43 | 27,3±1,7 | 41,1±2,1 | 28,9±2,7 |
| <i>P. brassicacearum</i> | 53 | 27,1±1,8 | 40,9±2,4 | 22,9±1,5 |
| <i>P. fluorescens</i> | 40 | 26,1±2,1 | 40,4±2,4 | 30,3±2,9 |
| <i>P. migulae</i> 18RW | 53 | 26,2±1,4 | 40,5±2,0 | 23,1±2,3 |
| <i>P. vancouverensis</i> 37RW | 40 | 28,3±1,6 | 43,1±2,2 | 24,2±3,2 |

Таблица 28 – Результаты анализа ростстимулирующей активности штаммов (продолжение)

| Штамм | Средняя сырая биомасса, г/растение | | Средняя сухая биомасса, г/растение | |
|-------------------------------|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| | Побеги | Корни | Побеги | Корни |
| Контроль | 1,40±0,02 | 0,60±0,02 | 0,12±0,01 | 0,04±0,01 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 1,92±0,05 | 0,86±0,03 | 0,20±0,01 | 0,06±0,01 |
| <i>P. aureofaciens</i> | 1,48±0,04 | 0,63±0,03 | 0,15±0,01 | 0,04±0,01 |
| <i>P. brassicacearum</i> | 1,52±0,03 | 0,78±0,02 | 0,21±0,02 | 0,06±0,01 |
| <i>P. fluorescens</i> | 1,42±0,03 | 0,65±0,02 | 0,13±0,01 | 0,04±0,01 |
| <i>P. migulae</i> 18RW | 1,41±0,05 | 0,68±0,01 | 0,16±0,01 | 0,04±0,01 |
| <i>P. vancouverensis</i> 37RW | 1,59±0,03 | 0,80±0,02 | 0,21±0,02 | 0,06±0,01 |

3.1.6. Изучение безопасности потенциального штамма-антагониста

Вирулентность изучали при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении белым крысам и белым мышам суспензии клеток в физиологическом растворе. В период наблюдения (15 суток) клинических симптомов заболевания у животных не наблюдалось, гибель отсутствовала. Таким образом, ЛД₅₀ для крыс и мышей при внутрижелудочном введении превышает 10⁹ клеток, при внутрибрюшинном введении превышает 10⁸ клеток. Следовательно, испытанный штамм *P. asplenii* 11RW не вирулентен.

Для изучения диссеминации через 30 суток после внутрижелудочного и внутрибрюшинного введения белым мышам клеточной суспензии штамма *P. asplenii* 11RW делали посев методом отпечатков срезов внутренних органов животных (сердца, легких, печени, почек и селезенки) на агаризованную питательную среду. Рост штамма *P. asplenii* 11RW в высевах из органов животных при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении не обнаруживался. Таким образом, штамм *P. asplenii* 11RW не способен к диссеминации.

Для изучения токсичности прогретую суспензию штамма *P. asplenii* 11RW вводили мышам внутрибрюшинно. В течение срока наблюдения (15 суток) гибели мышей не было.

Таким образом, компоненты клеток штамма *P. asplenii* 11RW не токсичны для лабораторных животных.

Токсигенность изучали на беспородных белых мышах при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении фильтратов 3- и 7-суточных культуральных жидкостей в 3 дозах. На протяжении всего срока наблюдения (5 суток) клинических симптомов заболевания и гибели животных не было. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсигенности у испытанного штамма *P. asplenii* 11RW.

Таким образом, по показателям вирулентности, диссеминации, токсичности и токсигенности штамм *P. asplenii* 11RW является не патогенным для теплокровных животных.

3.1.7. Заключение к разделу 3.1.

В настоящем исследовании была создана коллекция бактерий, выделенных из различных растительных и почвенных объектов. Бактериальные изоляты систематизировали по антагонистической и фитогормональной активности, и отобрали наиболее активные штаммы по комплексу анализируемых показателей.

По результатам предварительного испытания выявили высокую перспективность штамма *P. asplenii* 11RW как возможного продуцента для создания микробиологического препарата для сельского хозяйства, поэтому он был отобран для дальнейшего исследования. В частности, показали его высокую фунгицидную активность, способность к продуцированию ИУК и ростстимуляцию, отсутствие фитотоксичности и патогенности для теплокровных животных.

Практически ценная культура *P. asplenii* 11RW депонировали во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов по процедуре национального патентного депонирования под регистрационным номером В-13395.

3.2. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ СВОЙСТВА ШТАММА *P. ASPLENII* 11RW

3.2.1. Культуральные, физиолого-биохимические свойства штамма *P. asplenii* 11RW

Культура *P. asplenii* 11RW представляет собой короткие одиночные грамотрицательные палочки. Штамм является мезофилом (диапазон температур – 20-37°C, оптимум 30±2°C), предпочитает нейтральные или слабо-щелочные условия (диапазон pH – 5,5-8,0, оптимум – 7,0-7,5), способен расти при 4% NaCl в среде (таблица 29).

Таблица 29 – Результаты определения физиологических оптимумов штамма *P. asplenii* 11RW на 3-и сутки культивирования в жидкой среде King's B

| Показатель | Значение | Оптическая плотность, ОП ₆₀₀ |
|-------------|----------|---|
| NaCl | 0% | 0,257 |
| | 2% | 0,261 |
| | 4% | 0,250 |
| | 6% | 0,040 |
| | 8% | 0,020 |
| | 10% | 0,017 |
| pH | 4,5 | 0,015 |
| | 5,0 | 0,017 |
| | 5,5 | 0,297 |
| | 6,0 | 0,352 |
| | 6,5 | 0,405 |
| | 7,0 | 0,491 |
| | 7,5 | 0,483 |
| | 8,0 | 0,136 |
| | 8,5 | 0,021 |
| | 9,0 | 0,013 |
| Температура | 4°C | 0,014 |
| | 8°C | 0,018 |
| | 12°C | 0,057 |
| | 16°C | 0,119 |
| | 20°C | 0,232 |
| | 24°C | 0,315 |
| | 28°C | 0,465 |
| | 32°C | 0,459 |
| | 36°C | 0,407 |
| | 37°C | 0,398 |
| 40°C | 0,021 | |

При культивировании на агаризованных средах R2A и ГМФ при 30°C через 24 часа образует бежевые колонии диаметром 1 мм. Через 72 часа на указанных средах штамм выделяет водорастворимый флуоресцирующий пигмент.

При длительном хранении в жидких суспензиях штамм способен к спонтанной мутации и образует клетки, отличающиеся от исходной формы по морфологии колоний: исходный тип формирует гладкие круглые колонии с ровным краем, мутант – морщинистые с неровным краем (рисунок 3А). Подобное явление известно в литературе как “wrinkler spreader” и является адаптацией к новым условиям, при которой мутант имеет значительные преимущества перед исходным диким типом благодаря способности образовывать биопленку на границе раздела воздух-жидкость, что обеспечивает больший доступ к кислороду и позволяет расти быстрее, чем это возможно для необразующих биопленку конкурентов, расположенных в нижней аноксической области [272].

Штамм обладает выраженной протеолитической активностью (разжижает желатину), синтезирует липазу, оксидаз- и каталазположительный, утилизирует глюкозу, инозит и сорбит, реакция Фогеса-Проскауэра отрицательная, способен продуцировать H_2S .

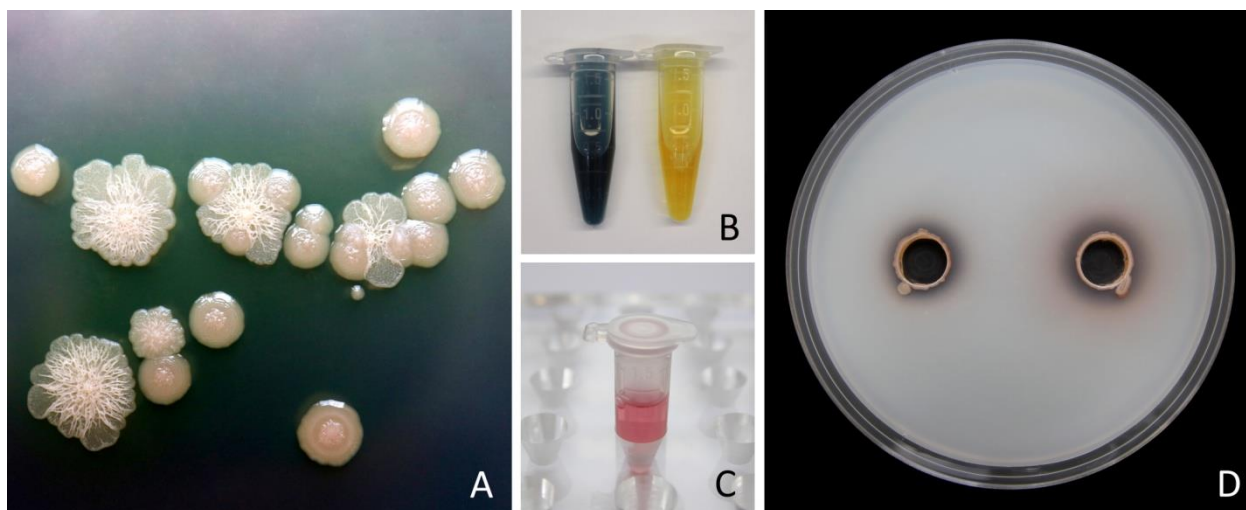


Рисунок 3 – Некоторые культуральные и биохимические свойства штамма *P. asplenii* 11RW: А – рост исходного типа и мутанта «wrinkler spreader» на среде R2A; В – синтез сидерофоров на среде SM (слева – контроль, справа – *P. asplenii* 11RW); С – синтез ИУК; D – фосфатмобилизующая активность

3.2.2. Количественный анализ синтеза сидерофоров

Для количественного определения сидерофоров в культуральной жидкости штамм *P. asplenii* 11RW выращивали на жидкой среде SM без источников железа. При смешивании бесклеточной культуральной жидкости с равным объёмом реактива CAS наблюдали изменение окраски реактива синего цвета на жёлто-оранжевый, что свидетельствовало о положительной продукции сидерофоров (рисунок 3В). Изменение окраски измеряли спектрофотометрически и определяли количество продуцируемых сидерофоров в культуральной жидкости, которое составило 92,3% сидерофорных единицы [273].

3.2.3. Спектр фунгицидного действия штамма

Спектр фунгицидного действия исследуемой бактерии проверяли на 108 штаммах фитопатогенных грибов различной таксономической принадлежности (р. *Alternaria*, *Fusarium*, *Cercospora*, *Phytophthora*, *Bipolaris*, *Pyricularia* и др.), являющихся возбудителями заболеваний основных сельскохозяйственных культур, древесных и декоративных растений. Перечень тестируемых патогенов указан в приложении 1.

Антагонистическую активность проверяли тремя методами. В первой серии опытов фунгицидную активность штамма проверяли методом диффузии в двухслойный агар (рисунок 4). Для анализа изучаемую культуру выращивали на жидкой среде King's B и вносили в лунки в инфицированной грибами среде КСА. Полученные результаты выявляют мощное фунгицидное действие штамма *P. asplenii* 11RW: при высокой нагрузке фитопатогенного фона в условиях *in vitro* данная бактерия активно ингибировала рост 106 из 108 проанализированных тест-объектов, исключение составили штаммы *Fusarium solani* (ВНИИС) и *Fusarium oxysporum* 96801. Средний размер зон ингибирования роста фитопатогенов составил от 15 до 77 мм [274-276].

Во второй серии опытов жидкую суспензию штамма вносили в растопленную и остывшую до 45°C среду КГА, разливали в чашки Петри, после чего на поверхность агара выкладывали блок фитопатогена. В работе использовали комплекс из 7 грибов, вызывающих гнили винограда. Выявили, что штамм *P. asplenii* 11RW на 10-е сутки культивирования показал эффективность более 90% в ингибировании роста 4 видов: *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Cladosporium herbarum*. Рост колонии *Aspergillus niger* штамм ингибировал на 5-е и 10-е сутки на 88,6 и 86% соответственно. Развитие таких грибов, как *Fusarium* sp. и *Macrophoma flaccida* подавлялось с интенсивностью 77,8% и 76,4% на 5-е сутки, 56,3% и 64,1% на 10-е сутки культивирования.

В третьей серии опытов фунгицидную активность штамма *P. asplenii* 11RW проверяли методом встречных культур на среде КСА, на край поверхности которой выкладывали блок фитопатогена, а на противоположный край штрихом высевали исследуемую культуру (рисунок 4). В работе использовали 2 микромицета р. *Alternaria* (*A. tenuis*, *A. tenuissima* 481-101) и 6 микромицетов р. *Fusarium* (*F. graminearum* 159811, *F. sibiricum*, *F. ussurianum* 29813, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* 58878). Результаты опытов также показали антагонистическое действие штамма на исследуемые грибы: так, наибольшую активность штамм проявил против *F. ussurianum* и *F. sibiricum*, выразившуюся в остановке роста грибов на середине чашки Петри.

Таким образом, результаты проведенного анализа подтвердили высокую активность исследуемого штамма против фитопатогенных грибов различного таксономического положения и выявили широкий спектр его фунгицидного действия. Способность активно подавлять развитие патогенов, по-видимому, объясняется продукцией сидерофоров, показанных в тестах на среде CAS, а также обнаруживаемым по появлению характерной желтой флюоресцирующей окраски вокруг колоний штамма *P. asplenii* 11RW.

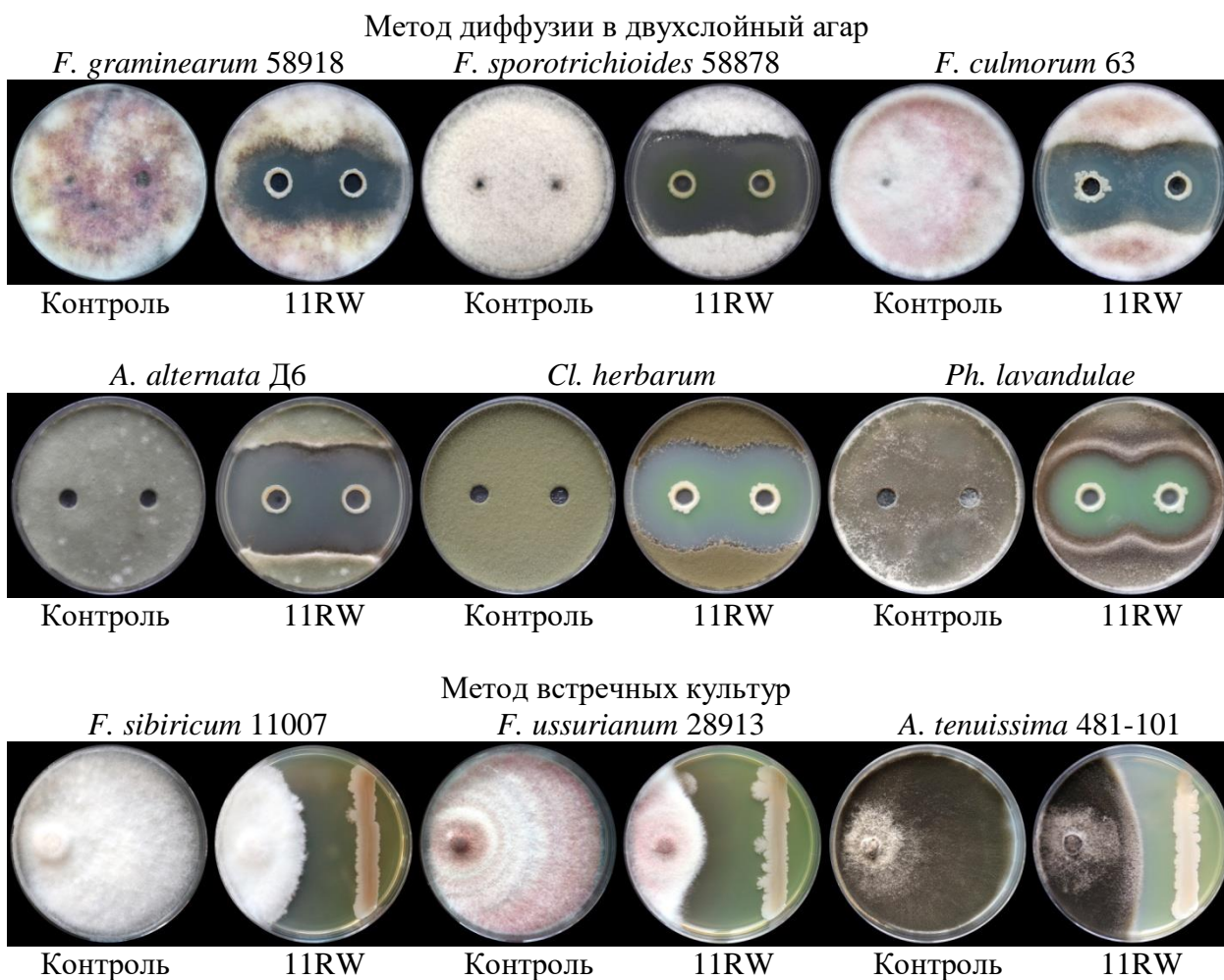


Рисунок 4 – Результаты анализа фунгицидной активности штамма *P. asplenii* 11RW против некоторых фитопатогенных грибов методом диффузии в агар и методом встречных культур

3.2.4. Влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на рост мицелия фитопатогенных грибов

Бактерии являются продуцентами широкого спектра летучих соединений (как органических, так и неорганических) с различной биологической активностью. Благодаря активному выделению летучих экзометаболитов, обладающих высокой проникающей способностью, ризобактерии могут обладать активными защитными свойствами. Так, отмечается фунгицидное действие газообразных веществ ризосферных штаммов, относящихся к родам *Pseudomonas* и *Bacillus*, выделенных из авокадо (*Persea americana* Mill.), против *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora cinnamomi*; среди их летучих соединений были идентифицированы кетоны, пиразины и серосодержащие соединения [277].

Также показано активное подавление 11 фитопатогенных грибов при воздействии летучего соединения 1-ундецен штамма *Pseudomonas* sp. ST-TJ4, выделенного из ризосферы

тополя [278]. Это же соединение было обнаружено доминирующим среди ЛОС другого активного антагониста *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* KNU17Pc1, проявляющего активность против *Colletotrichum dematium*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, *Fusarium subglutinans* и *Stemphylium lycopersici* [279].

В смеси летучих веществ, синтезируемых бактериями, помимо органических может содержаться и неорганическое летучее соединение, оказывающее токсический эффект на различные микроорганизмы, – цианид. Известно, что многие штаммы *Pseudomonas*, обладающие фунгицидной активностью, могут продуцировать летучий цианистый водород в присутствии предшественника глицина, широко встречающегося в корневых экзометаболитах [280].

Для изучения способности штамма к продукции фунгицидных летучих веществ провели опыт с одновременным культивированием штамма *P. asplenii* 11RW и фитопатогенных грибов без их непосредственного контакта (рисунок 5). Анализ проводили на 7 фитопатогенных микромицетах, результаты представлены в таблице 30.

Показали, что штамм *P. asplenii* 11RW синтезирует летучие соединения, обладающие фунгицидным действием против фитопатогенных грибов, к примеру, в бесконтактных системах разрастание мицелия грибов *A. tenuis*, *D. avenae*, *Rh. solani* и *Septoria* sp. под влиянием летучих метаболитов штамма *P. asplenii* 11RW полностью отсутствовало. Рост грибов *F. oxysporum* F-55071 и *F. sporotrichioides* 58871 при воздействии летучих экзометаболитов штамма не блокировался полностью, однако рост мицелия в этих вариантах был сильно редуцирован и ограничен [275].

Таблица 30 – Результаты анализа действия летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW на рост мицелия фитопатогенов

| Вариант | Средний диаметр разрастания мицелия, мм | |
|--|---|--|
| | Контроль | Под влиянием летучих веществ <i>P. asplenii</i> 11RW |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 79,3±0,4 | 0 |
| <i>Drechslera avenae</i> | 60,0±0,3 | 0 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> 170 | 84,7±0,4 | 0 |
| <i>Septoria</i> sp. | 53,7±0,3 | 0 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> F-55071 | 81,3±0,3 | 26,3±0,3 |
| <i>Fusarium sporotrichioides</i> 58871 | 84,8±0,4 | 14,9±0,3 |
| <i>Fusarium ussurianum</i> 29813 | 74,9±0,3 | 0 |

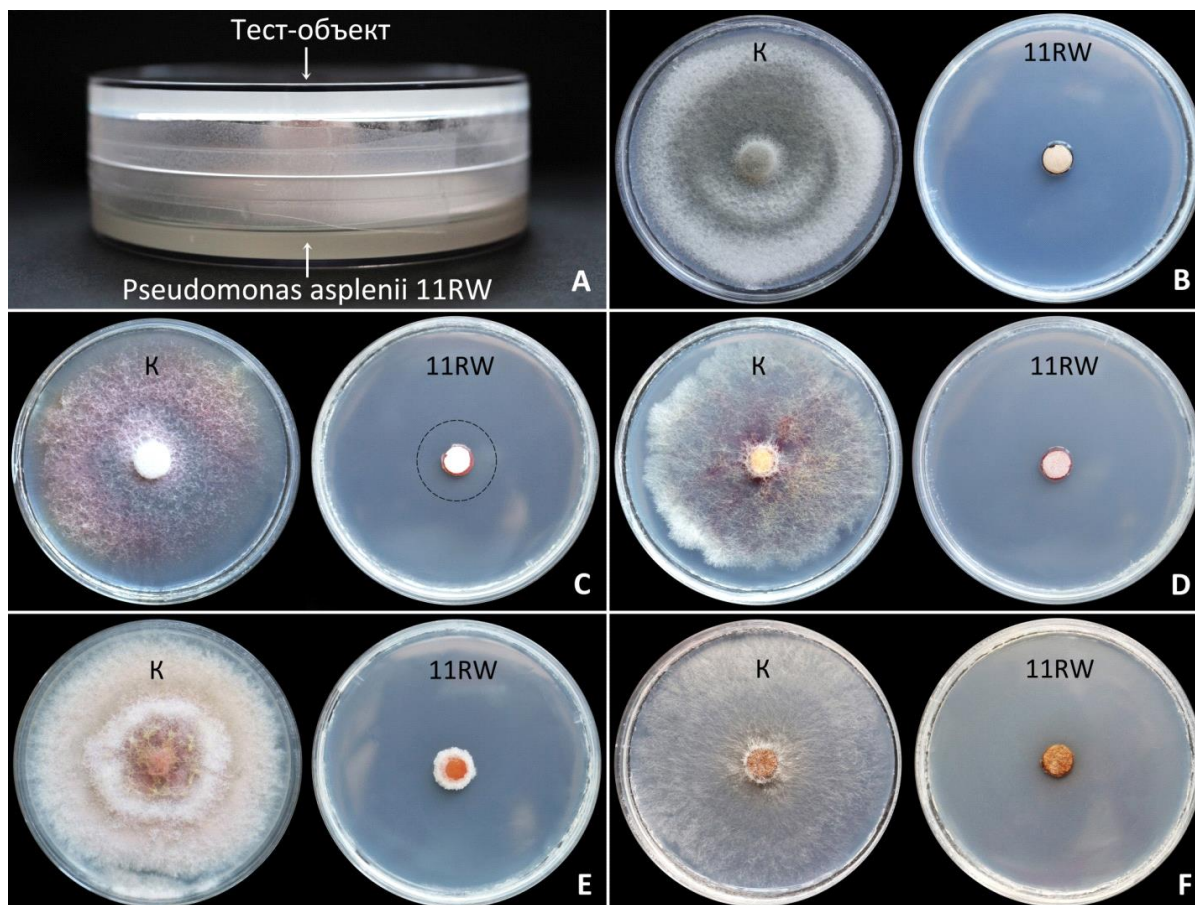


Рисунок 5 – Вид бесконтактной системы (А) и результаты оценки влияния летучих соединений, выделяемых штаммом *P. asplenii* 11RW, на рост *Alternaria tenuis* (В), *Fusarium oxysporum* F-55071 (С), *Fusarium ussurianum* 29813 (D), *Fusarium sporotrichioides* 58871 (Е) и *Rhizoctonia solani* 170 (F) в сравнении с контролем (К)

3.2.5. Влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на прорастание конидий фитопатогенных грибов

Анализируемый штамм также проверили на способность ингибировать прорастание конидий фитопатогенов за счет действия летучих соединений без непосредственного контакта бактерии и гриба. Результаты опыта представлены в таблице 31.

Показали, что штамм *P. asplenii* 11RW не только подавляет развитие мицелия грибов, но и структур бесполого размножения: так, без непосредственного контакта за счет действия летучих соединений наблюдали активное подавление прорастания конидий грибов *Alternaria tenuissima* 481-101 (рисунок 6) и *Bipolaris sorokiniana* (рисунок 7). Данный эффект проявлялся уже через 24 ч и сохранялся к 7-м суткам инкубирования посевов. При этом под действием летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW у *B. sorokiniana* появлялись аномалии прорастающих конидий, выражающиеся в морфологических изменениях ростковых трубок, остановке в росте гиф с их последующим лизисом.

Таблица 31 – Результаты анализа действия летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW на прорастание конидий

| Фитопатоген | Вариант | Вид конидий | Количество конидий, % | |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|---------|
| | | | 24 ч | 7 суток |
| <i>B. sorokiniana</i> | Контроль | Проросшие | 70,1 | 98,9 |
| | | Непроросшие | 29,9 | 1,1 |
| | <i>P. asplenii</i> 11RW | Аномально проросшие | 61,7 | 62,1 |
| | | Непроросшие | 38,3 | 37,9 |
| <i>A. tenuissima</i> 481-101 | Контроль | Проросшие | 77,6 | 99,0 |
| | | Непроросшие | 22,4 | 1,0 |
| | <i>P. asplenii</i> 11RW | Проросшие | 16,4 | 16,4 |
| | | Непроросшие | 83,6 | 83,6 |

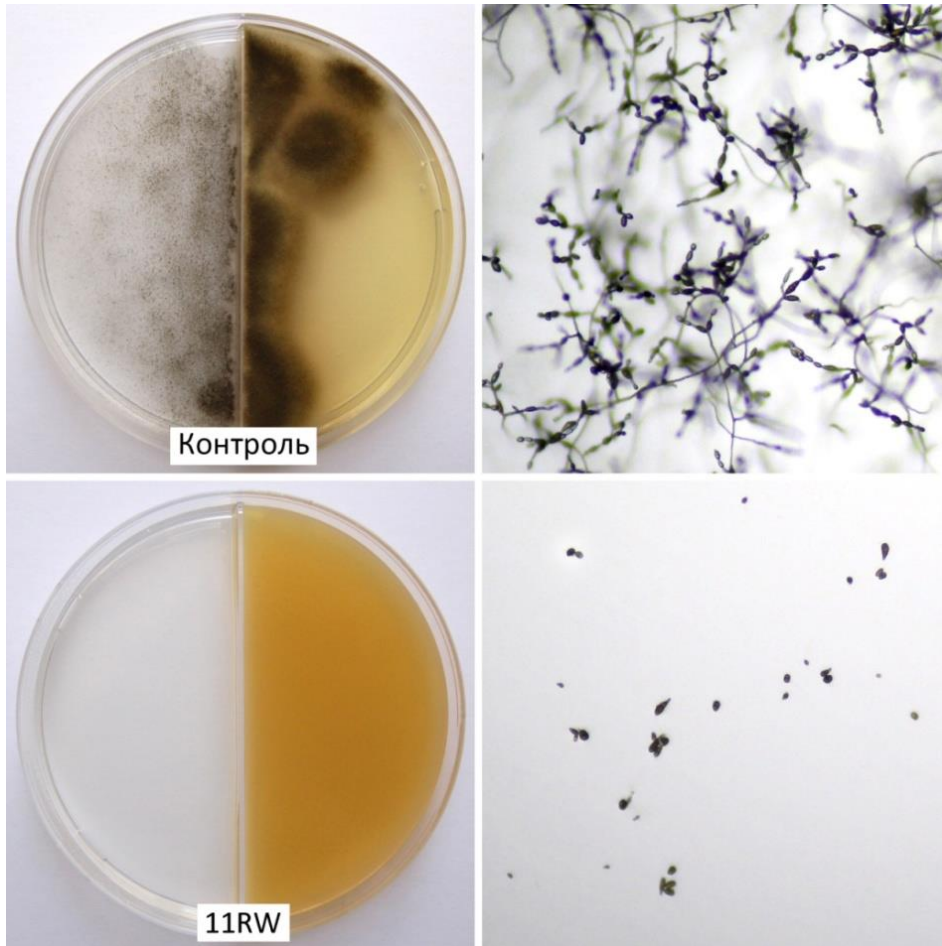


Рисунок 6 – Вид двухсекционных чашек Петри и развитие конидий *A. tenuissima* в контроле и при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на 7-ые сутки инкубирования

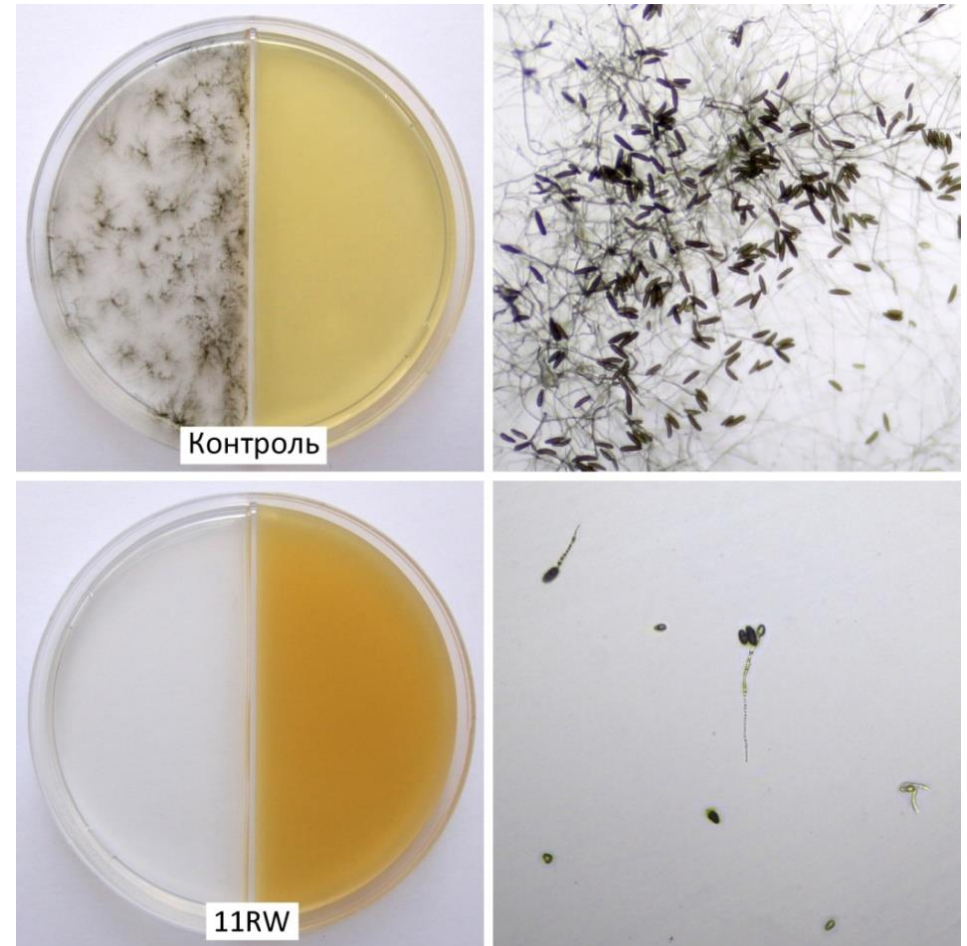


Рисунок 7 – Вид двухсекционных чашек Петри и развитие конидий *B. sorokiniana* в контроле и при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на 7-ые сутки инкубирования

3.2.6. Ростстимулирующее влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW

Наряду с антагонистическим действием исследователи отмечают и рострегуляторный эффект летучих экзометаболитов. Так, сообщается об увеличении сухой и сырой массы резуховидки Таля (*A. thaliana* L.) при воздействии летучих веществ, продуцируемых *B. amyloliquefaciens* FZB42 [281]. Другие авторы сообщают о 5-кратном увеличении площади листовой поверхности табака (*Nicotiana attenuata* Torr. ex S. Watson), а также удлинении корня при воздействии летучих соединений, выделяемых *Bacillus* sp. B55 [282].

Среди стимулирующих рост ЛОС исследователями были идентифицированы 3-гидрокси-2-бутанон (ацетоин), 2,3-бутандиол, 2-пентилфуран и диметилгексадециламин. Немногочисленные исследования указывают, что летучие соединения действуют на уровне регуляции фитогормонов и метаболических путей, однако механизмы действия стимуляции роста растений еще плохо изучены [283].

Влияние летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW на рост и развитие растений было оценено в 2-х опытах с проращиванием семян табака без непосредственного контакта с анализируемым бактериальным штаммом.

В первой части опытов семена табака проращивали при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW без непосредственного контакта в двухсекционных чашках Петри на половинной среде Мурасиге-Скуга. Было обнаружено, что газообразные метаболиты штамма *P. asplenii* 11RW обладают не только фунгицидным действием, но и способны стимулировать рост растений. Так, выявили, что проростки табака в данном варианте имели значительно более развитую корневую систему и вегетативную массу, а также более яркую пигментацию листьев. При этом развитие проростков в контрольном варианте было значительно редуцировано, и их рост быстро останавливался вследствие недостатка питания из питательной среды, содержащей лишь половину стандартного состава (таблица 31, рисунок 8).

Во второй части опытов семена табака проращивали при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW в стерильном вермикулите. В данном эксперименте контакт между прорастающими семенами и газообразными соединениями штамма был наиболее опосредованный и имел барьер в виде дна пластикового стаканчика и слоя вермикулита. Однако, в созданных условиях также показали ростстимулирующий эффект летучих метаболитов штамма, что согласуется с результатами первого опыта (таблица 32).

Таблица 32 – Результаты анализа действия летучих веществ штамма *P. asplenii* 11RW на развитие проростков табака

| Вариант | Опыт 1 (чашки Петри) | | | | Опыт 2 (вермикулит) | |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Сорт Трапезонд -92 | | Сорт Вирджиния 202 | | Сорт Трапезонд -92 | |
| | Средняя сырая биомасса, мг/раст | Средняя сухая биомасса, мг/раст | Средняя сырая биомасса, мг/раст | Средняя сухая биомасса, мг/раст | Средняя сырая биомасса, мг/раст | Средняя сухая биомасса, мг/раст |
| Контроль | 43,0±0,9 | 3,5±0,08 | 14,0±0,1 | 1,1±0,03 | 116,7±0,7 | 8,3±0,16 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 159,0±1,4 | 10,0±0,06 | 149,6±0,7 | 10,7±0,05 | 215,1±0,7 | 14,2±0,20 |



Рисунок 8 – Вид табака сорта Трапезонд-92 в контроле (слева) и при воздействии летучих соединений штамма *P. asplenii* 11RW (справа)

3.2.7. Бактерицидная активность штамма *P. asplenii* 11RW

Бактерицидную активность проверяли на 11 штаммах фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* и *Xanthomonas*, указанных в приложении 1.

Результаты опыта показали, что штамм 11RW, обладающий высокой фунгицидной активностью, обладает также и бактерицидным действием: так, методом диффузии в двухслойный агар, инфицированный анализируемыми патогенами, обнаружили подавление роста 5 тест-объектов: *Pectobacterium carotovorum* 480, *P. syringae* БИМ В-280, *Xanthomonas arboricola* В-614, *X. arboricola* В-628, *X. vasicola* В-618.

3.2.8. Синтез ИУК и его производных

Индолил-3-уксусная кислота, наиболее распространённый и охарактеризованный фитогормон, продуцируемый бактериями группы PGPR, является одним из наиболее физиологически активных ауксинов.

Для выявления способности к синтезу фитогормона типа ауксинов, определяющего фитостимуляцию, использовали реактив Сальковского, дающий характерное розово-красное окрашивание. Наиболее интенсивное окрашивание соответствует наиболее интенсивному продуцированию ИУК и ее производных.

Культуральная жидкость штамма, выращенная на среде R2A с добавлением 500 мг/л L-триптофана, окрашивалась реактивом в розовый цвет, что свидетельствовало о положительной способности штамма синтезировать индольные соединения (рисунок 3С). Концентрация ИУК при этом составила 31,8 мкг/мл.

3.2.9. Фосфатмобилизующая активность штамма

Азот и фосфор являются двумя наиболее лимитирующими элементами питания в почве, также как и наиболее стимулирующими развитие растений. В настоящее время фосфатные удобрения обладают высокой стоимостью, а присутствующие в почве неорганические фосфаты характеризуются низкой доступностью. Поэтому применение бактерий, способных к активной солюбилизации фосфора, представляет большой практический интерес [69].

Один из главных механизмов солюбилизации фосфора является продукция ассоциированными с ризосферой растений бактериями низкомолекулярных органических кислот, синтез которых может обнаруживаться по закислению питательной среды или почвы [68]. Наиболее эффективные процессы фосфатмобилизации обнаруживаются у грамотрицательных бактерий, обусловленные внеклеточным окислением глюкозы до глюконовой кислоты [284].

В данном исследовании изучаемый штамм проверяли на способность к солюбилизации фосфора. Через 10 суток культивирования на агаризованной среде Пиковской с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора обнаруживали зоны просветления, свидетельствующие о способности штамма *P. asplenii* 11RW к растворению трикальцийфосфата (рисунок 3D), диаметр гало при этом составил 16 мм.

3.2.10. Продукция аммония

Другой важной характеристикой PGPR-бактерий является продукция аммония, который опосредованно улучшает рост растений, а также играет роль в сигналинге в системе растение-ризобактерия [285].

Результаты опыта с выявлением аммония при добавлении в пептонную воду реактива Несслера показывают положительную реакцию штамма *P. asplenii* 11RW.

3.2.11. Ростстимулирующая активность штамма *P. asplenii* 11RW в опыте *in vitro*

Одним из важных этапов скрининга является оценка ростстимулирующего действия изучаемого объекта на развитие сельскохозяйственных культур.

Для первичной оценки проводили анализ ростстимулирующей активности на семенах кресс-салата сорта «Данский». Для замачивания семян готовили рабочие растворы штамма *P. asplenii* 11RW с титром клеток 10^4 - 10^8 КОЕ/мл, инкубацию проводили во влажных камерах (чашках Петри) в течение 5 суток.

Отмечено, что сниженные концентрации жизнеспособных клеток штамма *P. asplenii* 11RW в рабочей жидкости оказывали стимулирующее действие на длину корневой системы кресс-салата, наибольший эффект показан при использовании суспензии с титром 10^5 КОЕ/мл, при этом длина главного корня увеличивалась в среднем на 37,8% по сравнению с негативным контролем (таблица 33).

Таблица 33 – Результаты анализа ростстимулирующего действия на проростках кресс-салата сорта «Данский»

| Вариант | Титр клеток в рабочем растворе, КОЕ/мл | Средняя длина корня, мм |
|-------------------------|--|-------------------------|
| Контроль | - | 75,6±2,9 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 10^8 | 67,8±2,7 |
| | 10^7 | 75,9±3,5 |
| | 10^6 | 89,6±3,2 |
| | 10^5 | 104,2±3,4 |
| | 10^4 | 84,4±3,4 |

3.2.12. Ростстимулирующая активность штамма *P. asplenii* 11RW в опытах *in planta*

Ростстимулирующее действие наиболее перспективного штамма *P. asplenii* 11RW также показали в условиях микровегетационного эксперимента на растениях пшеницы, ячменя и кукурузы. Обработка семян бактериальными суспензиями с титром жизнеспособных клеток 10^9 КОЕ/мл, расходом суспензий 1 л/т и рабочего раствора 10 л/т оказало положительное влияние на всхожесть, рост и развитие растений, обеспечив прибавку роста надземной части, так и биомассы растений (таблица 34). Так, в варианте обработки семян ячменя штаммом

P. asplenii 11RW средняя длина растений и общая сухая биомасса превышала контрольные значения в среднем на 21,2% и 29,4% соответственно, в варианте обработки кукурузы – 11,5% и 50,7% соответственно [273].

Таблица 34 – Результаты микровегетационных опытов

| Вариант | Всхожесть, % | Средняя длина побегов, см | Средняя длина корней, см | Средняя сухая биомасса, г/раст |
|--------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Пшеница сорта Дарья (36 суток) | | | | |
| Контроль | 93 | 39,4±1,1 | 17,2±0,5 | 0,22±0,03 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 95 | 41,0±1,5 | 16,9±0,9 | 0,24±0,02 |
| Ячмень сорта Таловский (36 суток) | | | | |
| Контроль | 75 | 31,6±1,3 | 18,6±0,9 | 0,17±0,02 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 83 | 38,3±1,0 | 18,9±0,8 | 0,22±0,01 |
| Кукуруза гибрида Симпатия (41 сутки) | | | | |
| Контроль | 60 | 55,6±4,6 | 27,3±3,8 | 0,75±0,04 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 67 | 62,0±3,1 | 28,1±2,1 | 1,13±0,05 |

3.2.13. Колонизирующая способность штамма *P. asplenii* 11RW

Колонизация корней растений интродуцируемыми высокоэффективными микроорганизмами является наиболее важным моментом для функционирования высокоэффективных растительно-бактериальных ассоциаций. Перспективные штаммы-антагонисты должны активно заселять ризосферу и ризоплану растений и быть конкурентоспособными по отношению к другим микроорганизмам, населяющим корневую систему.

Изучение колонизирующей активности штамма *P. asplenii* 11RW проводили на растениях пшеницы сорта «Скэнт-3» в условиях гнотобиологических систем. Как показали результаты проведенных опытов, анализируемый перспективный штамм, будучи выделенным из ризосферной почвы, способен эффективно колонизировать корневую систему пшеницы (таблица 35-37). Выявлено, что общая заселенность корней проростков пшеницы штаммом *P. asplenii* 11RW к 12-м суткам составляла 10^8 КОЕ/корень.

Таблица 35 – Результаты анализа колонизирующей активности

| Вариант обработки семян | Время выращивания, сутки | Титр суспензии, используемой для инокуляции, КОЕ/мл | Количество бактерий в ризосфере, КОЕ/корень | |
|-------------------------|--------------------------|---|---|---------------------------|
| | | | <i>P. asplenii</i> 11RW | Сопутствующая микрофлора* |
| Контроль | 7 | - | 0 | $1,0 \cdot 10^8$ |
| | 12 | | 0 | $1,7 \cdot 10^8$ |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 7 | $5,4 \cdot 10^7$ | $1,4 \cdot 10^8$ | $2,3 \cdot 10^7$ |
| | 12 | | $3,2 \cdot 10^8$ | $7,9 \cdot 10^7$ |

Таблица 36 – Результаты анализа колонизирующей активности (продолжение)

| Вариант обработки семян | Время выращивания, сутки | Титр суспензии, используемой для инокуляции, КОЕ/мл | Количество бактерий в ризоплане и эндосфере, КОЕ/корень | |
|-------------------------|--------------------------|---|---|---------------------------|
| | | | <i>P. asplenii</i> 11RW | Сопутствующая микрофлора* |
| Контроль | 7 | - | 0 | $1,1 \cdot 10^7$ |
| | 12 | | 0 | $2,8 \cdot 10^7$ |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 7 | $5,4 \cdot 10^7$ | $1,3 \cdot 10^7$ | $8,5 \cdot 10^6$ |
| | 12 | | $2,5 \cdot 10^7$ | $1,4 \cdot 10^7$ |

Таблица 37 – Результаты анализа колонизирующей активности (продолжение)

| Вариант обработки семян | Время выращивания, сутки | Титр суспензии, используемой для инокуляции, КОЕ/мл | Общая заселенность, КОЕ/корень | |
|-------------------------|--------------------------|---|--------------------------------|---------------------------|
| | | | <i>P. asplenii</i> 11RW | Сопутствующая микрофлора* |
| Контроль | 7 | - | 0 | $1,1 \cdot 10^8$ |
| | 12 | | 0 | $2,0 \cdot 10^8$ |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 7 | $5,4 \cdot 10^7$ | $1,5 \cdot 10^8$ | $3,2 \cdot 10^7$ |
| | 12 | | $3,5 \cdot 10^8$ | $9,3 \cdot 10^7$ |

* *Примечание:* наличие сопутствующей микрофлоры обусловлено наличием внутри поверхностно стерилизованных семян пшеницы бактерий-эндофитов, которые заселяют формирующуюся корневую систему после прорастания семени

3.2.14. Антагонистические свойства перспективного штамма в опытах *in planta*

Анализ конкурентоспособности в гнотобиологических экспериментах является лишь первым этапом в изучении их колонизационных свойств. Биоконтрольные штаммы в полевых условиях должны обладать способностью приживаться в ризосфере растений, сохраняя свою численность в достаточных пределах для проявления биоконтрольного эффекта.

Показанная ранее колонизирующая способность штамма *P. asplenii* 11RW и его быстрая интродукция в ризосферу пшеницы позволяет эффективно реализовывать свои фитопротекторные функции. Так, в опыте по биоконтролю корневой гнили, вызванной при искусственном заражении *F. culmorum* 63, было отмечено, что обработка семян пшеницы изучаемым штаммом снижало развитие заболевания с 71,4 до 25%. Развитие гнили отмечали по побурению участков корней и появлению штрихов и пятнистостей стеблей в прикорневой зоне (рисунок 9).



Рисунок 9 – Вид проростков пшеницы в контрольном варианте (слева) и после обработки семян штаммом *P. asplenii* 11RW (справа), выращенных в условиях искусственного заражения *F. culmorum* 63

Также проанализировали влияние различных доз суспензии штамма *P. asplenii* 11RW на антагонистические и рострегуляторные функции в условиях искусственного заражения *F. culmorum* 30. Созданный инфекционный фон в эксперименте был чрезвычайно высок: в контрольном варианте без искусственного заражения наблюдалось значительное развитие внутрисеменной инфекции (88,2%), а при искусственном инфицировании была достигнута 100%-ная зараженность проросших зерновок. При этом штамм *P. asplenii* 11RW в созданных условиях снижал развитие микромицетов в среднем на 23,5-29,4%. А также был показан ростстимулирующий эффект на развитие растений, выразившийся в удлинении вегетативной части и корневой системы проростков пшеницы даже в условиях высокого инфекционного фона (таблица 38, рисунок 10).

Таблица 38 – Результаты анализа антагонистической активности *P. asplenii* 11RW на проростках пшеницы сорта «Скэнт-3» в условиях искусственного заражения *F. culmorum* 30

| Вариант | Всхожесть, % | Зараженность, % | Средняя длина побега, см | Средняя длина корня, см |
|--------------------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|
| Контроль (без заражения) | 52,9 | 88,2 | 12,6±1,9 | 7,8±1,2 |
| Контроль + <i>F. culmorum</i> 30 | 76,5 | 100 | 13,3±1,2 | 6,1±0,5 |
| 11RW (1 л/т) + <i>F. culmorum</i> 30 | 70,6 | 76,5 | 19,4±0,9 | 9,4±0,4 |
| 11RW (2 л/т) + <i>F. culmorum</i> 30 | 64,7 | 76,5 | 18,6±0,6 | 8,1±0,3 |
| 11RW (3 л/т) + <i>F. culmorum</i> 30 | 76,5 | 70,6 | 19,2±0,6 | 8,4±0,3 |

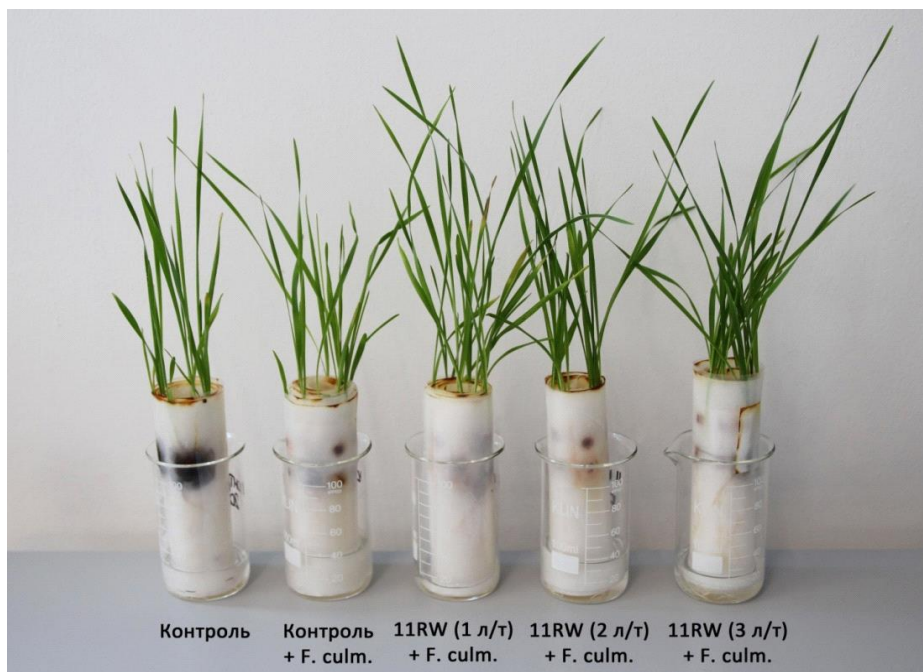


Рисунок 10 – Вид проростков пшеницы, выращенных в условиях искусственного заражения *Fusarium culmorum* 30

3.2.15. Заключение к разделу 3.2

Проведено и опубликовано большое количество исследований, демонстрирующих возможности и потенциал видов *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. brassicacearum*, *P. chlororaphis* в качестве PGPR, а также их коммерческого использования в качестве продуцентов для создания микробиологических препаратов. И чрезвычайно мало данных, касающихся исследования вида *P. asplenii*. В связи с этим, детальное изучение данной бактерии представляет большой научный и практический интерес.

В настоящем исследовании штамм *P. asplenii* 11RW был выделен из ризосферной почвы озимой пшеницы и по результатам первичного скрининга отобран из созданной коллекции как наиболее перспективный штамм. В проведенных тестах проанализировали его основные хозяйственно-ценные свойства. Главным образом показали высокую фунгицидную активность и широкий спектр подавления роста фитопатогенных грибов.

Также штамм *P. asplenii* 11RW показал способность к синтезу аммония и солиubilизации нерастворимого фосфата кальция. Это означает, что присутствие данной бактерии в ризосфере может обеспечить растение доступным азотом и фосфором. Более того, изучаемый штамм также способен к продукции сидерофоров и летучих органических соединений, обладающих фунгицидным и ростстимулирующим действием, которые способны косвенно улучшить рост и развитие растения вследствие высокой сопротивляемости болезням.

Однако помимо изучения перспективных объектов в условиях *in vitro* селекция эффективных продуцентов должна обязательно включать этап исследования поведения штаммов в реальных условиях ризосферы. Было установлено, что изучаемый штамм *P. asplenii* 11RW способен активно заселять ризоплану и ризосферу сельскохозяйственных культур. В биоконтрольных опытах показали высокий антагонистический потенциал перспективного штамма по отношению к возбудителям грибных заболеваний. А также продемонстрировали ростстимулирующее действие на развитие сельскохозяйственных культур в микроvegetационных опытах. Таким образом, отобранный штамм обладает высоким потенциалом для применения в сельском хозяйстве и может быть использован в качестве продуцента для дальнейшей разработки микробиологического препарата.

По результатам оценки хозяйственно-ценных свойств, подтверждающих высокую практическую ценность, на изучаемый штамм был получен патент РФ №2711873 «Бактериальный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW для защиты растений от болезней» [286].

3.3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ *P. ASPLENII* 11RW

3.3.1. Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW

В настоящей главе изучили процесс глубинного культивирования анализируемого штамма с целью отработки технологических режимов получения культуры с максимально высоким титром жизнеспособных клеток.

Изучили влияние состава некоторых жидких питательных сред, используемых для выращивания штамма *P. asplenii* 11RW, на содержание жизнеспособных клеток. В работе использовали 5 питательных сред: R2A, King's B, бульон на основе гидролизата мяса ферментативного (ГМФ), минеральная среда с мелассой, минеральная среда с глюкозой. В таблице 39 представлены данные о содержании жизнеспособных клеток изучаемой культуры при выращивании на различных средах через 24 и 48 ч. Было установлено, что наиболее оптимальной средой, позволяющей достичь максимально высокий титр клеток, является минеральная среда с мелассой.

Таблица 39 – Влияние состава питательных сред на титр жизнеспособных клеток штамма *P. asplenii* 11RW

| Питательная среда | 24 ч | | 48 ч | |
|------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| | ОП ₆₀₀ | Средний титр, млрд КОЕ/мл | ОП ₆₀₀ | Средний титр, млрд КОЕ/мл |
| R2A | 0,093 | 0,51±0,02 | 0,138 | 3,04±0,07 |
| King's B | 0,361 | 2,96±0,14 | 0,429 | 5,47±0,16 |
| ГМФ-бульон | 0,611 | 6,18±0,17 | 0,904 | 20,60±1,08 |
| Минеральная среда с мелассой | 0,625 | 7,38±0,04 | 0,919 | 26,20±1,28 |
| Минеральная среда с глюкозой | 0,552 | 5,92±0,07 | 0,857 | 10,60±0,51 |

Изучение глубинного культивирования штамма проводили на лабораторном ферментере Biostat A (Sartorius Stedim, Германия) с рабочим объёмом 1 л и пилотном ферментере («Эй Пи Биосистемы», Москва) с рабочим объёмом 12 л, оснащенных датчиками растворенного кислорода, pH, температуры, перистальтическими насосами для корректировки pH и внесения добавок, с автоматической регулировкой параметров и компьютерным управлением.

Ранее на этапе изучения культуральных и физиолого-биохимических свойств (пункт 3.2.1) показали, что оптимум температур для культивирования штамма *P. asplenii* 11RW находится в диапазоне 30±2°C, оптимум pH – 7,0-7,5. Используя полученные данные, проводили глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW на минеральной среде с мелассой для определения скорости роста культуры в подобранных условиях (таблица 40, 41).

Таблица 40 – Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW в лабораторном ферментере Biostat A

| Инокулят | Условия культивирования | Проба | Оптическая плотность, ОП ₆₀₀ | Средний титр, млрд КОЕ/мл |
|--|--|---------|---|---------------------------|
| 16-часовая культура, выращенная в колбе; Объём – 10% | <i>Начальные параметры:</i> Температура – 30°C; pH=7,25; Аэрация: 1 л воздуха/1 л среды/мин; Перемешивание: 400 об/мин; Дальнейшее культивирование – с учетом | 0 часов | 0,081 | 0,28±0,01 |
| | | 1 час | 0,164 | 0,36±0,02 |
| | | 2 часа | 0,209 | 0,58±0,02 |
| | | 3 часа | 0,281 | 1,15±0,06 |
| | | 4 часа | 0,314 | 2,16±0,14 |

| | | | |
|--|----------|-------|------------|
| <p>потребности культуры в кислороде (поддержание содержания растворенного кислорода не менее 5-10%); температура и pH – неизменны.</p> <p>Подтитровка: 10% раствор NaOH и 10% раствор лимонной кислоты;</p> <p>Пенוגашение: Лапрол ПД-1.</p> | 5 часов | 0,353 | 3,05±0,06 |
| | 6 часов | 0,397 | 3,96±0,10 |
| | 7 часов | 0,429 | 4,61±0,08 |
| | 8 часов | 0,667 | 7,68±0,06 |
| | 9 часов | 0,843 | 13,36±0,86 |
| | 10 часов | 0,917 | 11,62±0,68 |
| | 11 часов | 0,953 | 10,87±0,15 |

Таблица 41 – Глубинное культивирование штамма *P. asplenii* 11RW в пилотном ферментере

| Инокулят | Условия культивирования | Проба | Оптическая плотность, ОП ₆₀₀ | Средний титр, млрд КОЕ/мл |
|--|---|------------|---|---------------------------|
| <p>16-часовая культура, выращенная в колбе; Объем – 8%</p> | <p><i>Начальные параметры:</i> Температура – 30°C; pH=7,25; Аэрация: 1 л воздуха/1 л среды/мин; Перемешивание: 400 об/мин;</p> <p>Дальнейшее культивирование – с учетом потребности культуры в кислороде (поддержание содержания растворенного кислорода не менее 5-10%); температура и pH – неизменны.</p> <p>Подтитровка: 10% раствор NaOH и 10% раствор лимонной кислоты;</p> <p>Пенוגашение: Лапрол ПД-1.</p> | 0 часов | 0,049 | 0,25±0,05 |
| | | 1 час | 0,053 | 0,33±0,01 |
| | | 2 часа | 0,117 | 0,34±0,01 |
| | | 3 часа | 0,291 | 0,85±0,11 |
| | | 4 часа | 0,416 | 3,31±0,12 |
| | | 5 часов | 0,587 | 4,38±0,31 |
| | | 6 часов | 0,621 | 7,10±0,56 |
| | | 7 часов | 0,708 | 7,31±0,47 |
| | | 8 часов | 0,772 | 8,40±0,87 |
| | | 9 часов | 0,861 | 14,20±1,10 |
| | | 10 часов | 0,931 | 12,38±1,46 |
| 11 часов | 0,974 | 10,73±0,28 | | |

По результатам проведенных опытов определили оптимальные условия для периодического культивирования штамма *P. asplenii* 11RW. Как и для всех аэробных культур, для активного роста штамм *P. asplenii* 11RW требователен к достаточному содержанию растворенного кислорода. Для лаг-фазы, длящейся в среднем 2-3 часа, оптимален универсальный режим аэрации 1 л воздуха/1 л питательной среды/мин, дальнейшее культивирование ведется по разработанному каскаду с поддержанием концентрации растворенного кислорода не менее 5-10%.

Во время логарифмического роста (3-9 час) штамм *P. asplenii* 11RW активно защелачивает культуральную среду. Оптимальное значение pH среды составил в среднем $7,25 \pm 0,2$, поддерживаемое на указанном уровне в течение всего периода культивирования. Более кислые значения оказывают на культуру тормозящее развитие действие.

С 6 по 9 час наблюдается максимальная скорость роста микроорганизма, сопровождаемого наибольшим потреблением кислорода и увеличением pH. К 9-му часу культивирования штамм достигает титра 10^{10} КОЕ/мл и выходит на стационарную фазу развития, после 10-го часа наблюдается снижение количества жизнеспособных клеток. Окончание процесса культивирования сопровождалось снижением потребления кислорода и увеличением его концентрации в среде, повышением pH и значительному помутнению культуральной жидкости.

При добавлении в питательную среду пеногасителя Лапрол ПД-1 в количестве 0,1% активного пенообразования во время культивирования не наблюдается и его дополнительного внесения не требуется.

Таким образом, с использованием лабораторного и пилотного ферментера с контролируемыми параметрами культивирования отработали технологические режимы получения культуральной жидкости перспективного штамма-продуцента. В качестве оптимальной среды выбрали среду на основе мелассы, отличающуюся низкой себестоимостью и доступностью компонентов. Средняя продолжительность культивирования штамма до достижения титра жизнеспособных клеток 10^{10} КОЕ/мл составляет 9 ч.

3.3.2. Создание стабильной композиции прототипа микробиологического препарата

Основной проблемой при создании микробиологических препаратов на основе грамотрицательных бактерий является непродолжительный срок хранения продукта вследствие быстрой гибели клеток. Один из многообещающих способов продления жизнеспособности культуры является внесение в препарат различных по химическому строению добавок [287]. В их качестве могут выступать полимеры (поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, альгинат натрия, гуммиарабик и др.), адьюванты (карбоксиметилцеллюлоза, ксантановая камедь,

каррагинан и др.), поверхностно-активные вещества (полисорбат 80, 40 и 20) [288], сахара (трегалоза, сахароза, глюкоза и др.) [289]. Вязкость полимеров помогает клеткам легко прилипать к семенам и замедляет процесс иссушения клеток после их нанесения. Поверхностно-активные вещества и адъюванты действуют как эмульгаторы и стабилизаторы [288]. Сахара широко используются для защиты микроорганизмов от изменений осмотического давления и также способствуют их хранению [289]. Так, сахара могут образовывать водородные связи с белками при отсутствии воды, тем самым предотвращая денатурацию белков во время обезвоживания [290], а также способны защищать клетки за счет стабилизации цитоплазмы [291].

Анализ литературных данных демонстрирует необходимость подбора индивидуальной добавки для каждого конкретно используемого штамма PGPR, поскольку не существует универсального соединения. Например, в исследовании Шислера с соавторами [292] наилучшее хранение *Pseudomonas* sp. наблюдалось при добавлении 20 г/л фруктозы или трегалозы, в другом исследовании – при добавлении лактозы [293], тогда как для *Pantoea agglomerans* наибольшим стабилизирующим действием обладала сахароза [294].

На данном этапе исследования изучили сроки хранения лабораторных образцов препарата, созданных на основе перспективного штамма *P. asplenii* 11RW. Для изучения возможности увеличения сроков хранения провели опыты с введением в состав препарата различных стабилизирующих добавок: карбоксиметилцеллюлозы (СМС), родопола (ксантановая камедь), гуммиарабика (камедь акации), поливинилпирролидона К-15 (PVP), полиэтиленгликоля 6000 (PEG), сахарозы, глюкозы, глицерина. Для создания различных образцов препаратов использовали культуру *P. asplenii* 11RW с титром 10^9 КОЕ/мл, к которой добавляли анализируемые стабилизаторы в различных концентрациях (состав указан в таблице 42). В качестве антиоксидантного агента добавляли аскорбиновую кислоту (АК) в конечной концентрации 0,02%. Полученные композиции закладывали на хранение при 4-6°C, после чего фиксировали изменение титра жизнеспособных клеток в динамике в течение 3-х лет.

Таблица 42 – Изменение титра *Pseudomonas asplenii* 11RW при хранении различных лабораторных композиций препарата

| Вариант | Концентрация, % (w/v) | Средний титр жизнеспособных клеток, млрд КОЕ/мл | | | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|-----------|-----------|------------|------------|----------------|-----------------|------------|------------|
| | | 0 суток | 1 месяц | 3 месяца | 6 месяцев | 1 год | 1 год 3 месяца | 1 год 6 месяцев | 2 года | 3 года |
| Контроль | - | 6,55±0,18 | 2,74±0,22 | 5,60±0,10 | 0,33±0,03 | 0,12±0,04 | 0,15±0,03 | 0,10±0,004 | 0,10±0,01 | 0,11±0,01 |
| Контроль + 0,02% АК | - | 6,65±0,15 | 1,12±0,08 | 3,00±0,12 | 0,26±0,05 | 0,12±0,02 | 0,15±0,03 | 0,10±0,003 | 0,11±0,01 | 0,16±0,01 |
| СМС + 0,02% АК | 1,0 | 3,65±0,22 | 3,33±0,09 | 0,19±0,01 | 0,15±0,01 | 0,13±0,03 | 0,17±0,04 | 0,04±0,002 | 0,04±0,01 | 0,06±0,001 |
| | 2,0 | 2,32±0,25 | 1,12±0,10 | 0,40±0,01 | 0,10±0,004 | 0,04±0,004 | 0,01±0,002 | 0,02±0,001 | 0,02±0,003 | 0,02±0,004 |
| | 2,5 | 1,15±0,11 | 0,02±0,01 | 0,05±0,01 | 0,07±0,004 | 0,03±0,005 | 0,01±0,001 | 0,01±0,001 | 0,01±0,001 | 0,01±0,001 |
| Родопол + 0,02% АК | 0,1 | 2,23±0,21 | 2,53±0,18 | 3,27±0,03 | 0,22±0,02 | 0,16±0,002 | 0,15±0,03 | 0,20±0,03 | 0,17±0,02 | 0,13±0,01 |
| | 0,25 | 1,35±0,16 | 3,03±0,12 | 2,27±0,37 | 0,55±0,07 | 0,45±0,004 | 0,24±0,03 | 0,21±0,01 | 0,16±0,01 | 0,14±0,02 |
| | 0,5 | 1,42±0,19 | 1,30±0,12 | 1,93±0,32 | 0,66±0,04 | 0,13±0,01 | 0,11±0,005 | 0,11±0,01 | 0,12±0,01 | 0,10±0,01 |
| Гуммиарабик + 0,02% АК | 2,5 | 4,23±0,33 | 3,22±0,29 | 3,15±0,03 | 0,37±0,05 | 0,12±0,01 | 0,17±0,02 | 0,03±0,004 | 0,02±0,001 | 0,08±0,01 |
| | 5,0 | 3,17±0,25 | 2,70±0,21 | 0,23±0,02 | 0,16±0,01 | 0,13±0,01 | 0,13±0,01 | 0,11±0,01 | 0,13±0,02 | 0,17±0,01 |
| PVP + 0,02% АК | 0,5 | 4,57±0,26 | 3,70±0,17 | 3,80±0,17 | 0,18±0,05 | 0,18±0,02 | 0,09±0,01 | 0,04±0,002 | 0,09±0,003 | 0,06±0,002 |
| | 1,5 | 6,73±0,20 | 2,69±0,16 | 5,27±0,09 | 0,17±0,06 | 0,18±0,03 | 0,04±0,02 | 0,04±0,003 | 0,04±0,01 | 0,07±0,01 |
| | 3,0 | 5,15±0,07 | 2,06±0,27 | 5,90±0,40 | 0,25±0,02 | 0,20±0,02 | 0,17±0,02 | 0,10±0,01 | 0,09±0,02 | 0,04±0,001 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| PEG 6000 + 0,02% АК | 0,5 | 6,03±0,10 | 0,22±0,07 | 0,45±0,02 | 0,45±0,02 | 0,23±0,02 | 0,35±0,05 | 0,21±0,01 | 0,19±0,01 | 0,15±0,01 |
| | 1,0 | 5,02±0,21 | 4,72±0,37 | 1,30±0,06 | 0,63±0,08 | 0,20±0,03 | 0,21±0,01 | 0,30±0,02 | 0,20±0,03 | 0,35±0,02 |
| | 2,0 | 7,45±0,10 | 0,33±0,14 | 0,90±0,06 | 0,53±0,02 | 0,54±0,05 | 0,44±0,01 | 0,32±0,04 | 0,21±0,02 | 0,19±0,01 |
| Сахароза + 0,02% АК | 1,0 | 5,83±0,23 | 1,72±0,22 | 2,07±0,43 | 0,48±0,05 | 0,35±0,03 | 0,11±0,003 | 0,20±0,03 | 0,24±0,01 | 0,30±0,05 |
| | 2,0 | 1,03±0,12 | 1,45±0,18 | 4,65±0,49 | 1,73±0,20 | 0,46±0,01 | 0,18±0,03 | 0,40±0,03 | 0,10±0,01 | 0,12±0,02 |
| Глюкоза + 0,02% АК | 1,0 | 1,73±0,15 | 1,35±0,32 | 0,11±0,01 | 0,23±0,02 | 0,47±0,02 | 0,20±0,04 | 0,13±0,01 | 0,28±0,03 | 0,13±0,03 |
| | 2,0 | 3,25±0,28 | 2,88±0,06 | 0,81±0,04 | 0,49±0,12 | 0,33±0,01 | 0,14±0,02 | 0,15±0,01 | 0,17±0,02 | 0,18±0,01 |
| Глицерин + 0,02% АК | 1,0 | 3,67±0,15 | 2,88±0,13 | 2,60±0,17 | 0,57±0,05 | 0,22±0,03 | 0,22±0,03 | 0,13±0,02 | 0,17±0,02 | 0,20±0,01 |
| | 2,0 | 7,03±0,29 | 6,02±0,28 | 4,80±0,40 | 1,15±0,05 | 0,24±0,02 | 0,10±0,01 | 0,23±0,04 | 0,21±0,03 | 0,11±0,003 |

Анализ изменения титра жизнеспособных клеток в течение 3-годичного хранения при пониженных температурах выявил высокие показатели сохранности жидкой культуры *P. asplenii* 11RW даже в отсутствии стабилизаторов и антиоксиданта. Так, в контрольном образце без внесения добавок на конец 3-го года хранения титр жизнеспособных клеток составил в среднем $1,1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, т.е. изменение титра относительно исходного уровня произошло только на 1 порядок, что считается значительным результатом для препаратов на основе неспорообразующих бактерий. Существенного влияния аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта выявлено не было.

Показали, что включение в состав полисахаридов (ксантановой камеди и гуммиарабика) не оказывало значительных стабилизирующих свойств. Вместе с этим данные стабилизаторы в высокой концентрации делали конечный продукт более густым и менее удобным в работе.

Также выявили, что карбоксиметилцеллюлоза и поливинилпирролидон, часто используемые в микробиологических формуляциях, не обладали стабилизирующим действием, наоборот, титр клеток штамма *P. asplenii* 11RW в их присутствии снижался быстрее в сравнении с контролем, а значит, что данные добавки обладали токсическим действием на культуру.

Варианты с включением в состав сахарозы (2%) и глицерина (2%) демонстрировали более стабильное хранение в течение первых 6 месяцев, здесь отмечалось сохранение исходного уровня жизнеспособных клеток, тогда как в контроле к этому времени происходило снижение титра на один порядок; к 3-му году хранения показатели сравнивались с контрольными значениями. Следовательно, данные добавки целесообразны для включения в состав только для непродолжительного срока хранения.

3.3.3. Фунгицидная активность лабораторных образцов препарата после периода хранения

Важным показателем качества микробиологического продукта является не только сохранность жизнеспособных клеток продуцента, но и его хозяйственно-ценных свойств. Некоторые лабораторные образцы препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW были проверены на способность реализовывать антагонистические свойства после продолжительного срока хранения в сравнении со свежеизготовленным образцом. Результаты анализа фунгицидной активности представлены в таблице 43.

Таблица 43 – Фунгицидная активность некоторых композиций препарата после периода хранения

| Вариант | Срок хранения | Средний титр, КОЕ/мл | Средний диаметр зоны подавления роста фитопатогена, мм | | |
|--|---------------|----------------------|--|------------------------|----------------------------------|
| | | | <i>A. solani</i> 473 | <i>A. alternata</i> Д6 | <i>F. sporotrichioides</i> 58878 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW (без стабилизаторов) | 0 суток | 10^{10} | 56,3±1,7 | 49,8±0,3 | 45,3±0,9 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW (без стабилизаторов) | 3 года | 10^8 | 61,3±1,7 | 47,8±0,3 | 45,8±0,6 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW + 2% глицерин | 3 года | 10^8 | 54,3±1,1 | 48,0±1,1 | 44,0±0,4 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW + 3% PVP | 3 года | 10^7 | 56,3±0,9 | 49,3±0,3 | 47,0±0,4 |

После инкубации посевов на агаре вокруг «лунок», в которые вносились анализируемые суспензии, было четко видно разрастание бактериальной культуры *P. asplenii* 11RW (рисунок 11), что являлось дополнительным доказательством жизнеспособности штамма в препарате через 3 года хранения. Обнаружили, что все анализируемые образцы независимо от срока хранения и титра жизнеспособных клеток обладали высокой фунгицидной активностью, не уступающей результатам анализа свежеизготовленного образца. Стоит отметить важный факт, что степень ингибирования роста фитопатогенов в варианте с титром 10^{10} КОЕ/мл и 10^7 КОЕ/мл была эквивалентной, что является хорошим показателем для перспективного использования препарата в качестве фунгицида для применения в сельском хозяйстве.

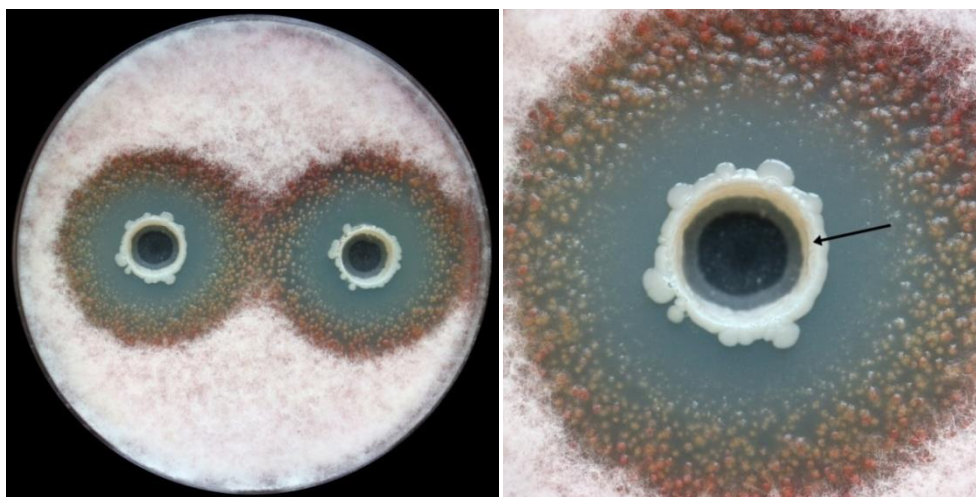


Рисунок 11 – Фунгицидная активность препарата (срок хранения 3 года, образец без стабилизаторов) против *F. sporotrichioides* 58878: стрелкой отмечено разрастание бактерии вокруг лунки

Таким образом, с учетом полученных данных, демонстрирующих высокое качество хранения культуры *P. asplenii* 11RW с сохранением антагонистических свойств, сформировали прототип препарата, изготавливаемый по разработанной технологии с учетом наиболее оптимальных для роста параметров и не содержащий в своем составе дополнительных стабилизаторов.

3.4. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ОПЫТНОГО ПРЕПАРАТА

Биологическую эффективность разработанного опытного препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW анализировали в лабораторных и полевых экспериментах против наиболее вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур. В качестве опытных образцов препарата выступала культуральная жидкость изучаемого штамма, выращенного на питательной среде с мелассой, с титром жизнеспособных клеток не менее 10^9 КОЕ/мл, не содержащая стабилизирующих добавок.

3.4.1. Сравнение эффективности лабораторного образца препарата в опытах с коммерческими микробиологическими препаратами

Дополнительным этапом исследования явилось изучение биологической эффективности разрабатываемого препарата в сравнении с коммерческими микробиологическими продуктами.

Для сравнительного анализа антифунгальных свойств использовали жидкие препараты Альбит, Биокомплекс-БТУ, Псевдобактерин-3 и Экстрасол. Фунгицидную активность проверяли против 4-х фитопатогенных грибов р. *Fusarium* и *Alternaria*. Результаты опыта представлены в таблице 44.

Таблица 44 – Фунгицидная активность препаратов

| Вариант | Средний диаметр зоны подавления роста фитопатогена, мм | | | |
|-------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | <i>F. culmorum</i> 63 | <i>F. oxysporum</i> F-55071 | <i>A. tenuissima</i> 481-101 | <i>A. alternata</i> 245 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 53,7±0,3 | 44,5±0,4 | 45,7±0,3 | 52,3±0,4 |
| Альбит | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Биокомплекс-БТУ | 24,7±0,4 | 27,8±0,3 | 26,0±0,4 | 28,0±0,6 |
| Псевдобактерин-3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Экстрасол | 0 | 0 | 15,8±0,6 | 12,8±0,6 |

Результаты демонстрируют и подтверждают высокую эффективность образца, созданного на основе изучаемого штамма *P. asplenii* 11RW: в данном варианте наблюдалось активное подавление роста всех проанализированных фитопатогенов.

Сопоставимого с *P. asplenii* 11RW антагонизма в опыте не обнаружили, однако показали фунгицидную активность препарата Биоконкомплекс-БТУ против 4-х тест-объектов, но образуемые зоны ингибирования роста грибов при этом были меньше по сравнению с вариантом *P. asplenii* 11RW. Препарат Экстрасол проявляет очень слабые антифунгальные свойства, а препараты Альбит и Псевдобактерин-3 в целом характеризовались отсутствием фунгицидной активности.

Также проанализировали рострегуляторную активность разрабатываемого препарата в сравнении с коммерческими биопрепаратами в микровегетационном опыте на семенах яровой пшеницы сорта «Омская-36», результаты представлены в таблице 45.

Таблица 45 – Результаты анализа рострегуляторных свойств препаратов в микровегетационном опыте

| Вариант | Всхожесть, % | Средняя длина побегов, см | | Средняя длина корней, см | Общая сухая биомасса, г/растение |
|-------------------------|--------------|---------------------------|----------|--------------------------|----------------------------------|
| | | 21 сутки | 41 сутки | 41 сутки | |
| Контроль | 95 | 25,9±0,9 | 41,2±1,0 | 16,9±0,9 | 0,076 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW | 95 | 27,3±1,2 | 43,2±0,9 | 19,0±1,3 | 0,126 |
| Альбит | 95 | 30,3±0,9 | 39,0±0,9 | 16,4±0,9 | 0,076 |
| Псевдобактерин-3 | 86 | 27,0±0,8 | 41,7±1,0 | 19,8±1,1 | 0,075 |
| Экстрасол | 86 | 25,8±1,2 | 42,0±1,0 | 20,8±1,4 | 0,072 |

Результаты эксперимента с предпосевной обработкой семян выявили ростстимулирующее действие лабораторного образца препарата на основе *P. asplenii* 11RW, причем увеличение растений происходило равномерно: вслед за удлинением надземной и подземной части увеличивалась и общая биомасса растений. Такого же эффекта в других вариантах отмечено не было, к примеру, при обработке семян препаратом Экстрасол увеличивалась только длина корневой системы, высота надземной части и биомасса растений при этом существенно не отличалась от контроля.

Таким образом, сравнительный анализ выявил, что лабораторный образец препарата, созданный на основе изучаемого штамма *P. asplenii* 11RW, является высокоэффективным и конкурентоспособным среди реализуемых микробиологических препаратов.

3.4.2. Испытание эффективности опытного образца препарата в полевых условиях

Получение высоких, стабильных, экономически оправданных урожаев на современном этапе сельхозпроизводства возможно только при условии эффективного контроля развития вредных организмов.

Последние исследования в области защиты растений посвящены гармоничному сочетанию всех известных методов и средств, направленных на эффективное сдерживание численности вредных организмов ниже экономического порога вредоносности. Важное значение в данном процессе принадлежит профилактике развития фитопатогенов с помощью современных высокоэффективных пестицидов и агрохимикатов, формированию ассортимента которых уделяется повышенное внимание. Приоритетным направлением исследований является изучение и внедрение в практику биологических препаратов с высокой биологической эффективностью, селективным действием и безопасным для нецелевых биообъектов [295-299].

3.4.2.1. Испытание опытного образца препарата в защите яблони

Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в течение 3-х лет в системе защиты яблони от парши *Venturia inaequalis* (2018-2020 гг.), мучнистой росы *Podosphaera leucotricha* и монилиальной плодовой гнили *Monilia fructigena* (2020 г) в условиях Краснодарского края.

В 2018 г испытание опытного образца препарата проводили на яблоне сорта Ренет Симиренко. На опытном участке парша развивалась по типу тардивной эпифитотии. В контрольном варианте на начало испытаний было поражено треть листового аппарата и половина плодов. Учет на 6-е и 10-е сутки после обработки показал, что после применения экспериментального образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW количество пораженных листьев и интенсивность их поражения не изменились, и образец успешно блокировал инфекцию парши на листьях и плодах, тогда как в контроле в этот период было зафиксировано нарастание инфекционного фона: количество пораженных листьев увеличилось в 1,3 раза, количество пораженных плодов – в 1,2 раза (таблица 46) [300].

Таким образом, опытный образец на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытали на высоковосприимчивом к парше сорте яблони в стандартных производственных условиях: во второй половине вегетации 2018 года, при высоком уровне распространения парши на обрабатываемых деревьях, среднем потенциале инокулюма в контроле. Опытный образец обеспечил высокую эффективность защиты от парши, период защитного действия от конидиальной инфекции составил 10 суток.

Таблица 46 – Биологическая эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против парши яблони сорта Ренет Симиренко, 2018 г

| Учет | Показатель, % | Листья | | Плоды | |
|------------------|------------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| | | Опытный образец | Контроль | Опытный образец | Контроль |
| Через 6 суток | P | 0,25 | 40,0 | 0,20 | 57,5 |
| | R | 0,05 | 22,0 | 0,06 | 27,0 |
| | БЭ | 99,8 | - | 99,8 | - |
| Через 10 суток | P | 0,25 | 52,5 | 0,20 | 62,0 |
| | R | 0,05 | 29,5 | 0,06 | 38,0 |
| | БЭ | 99,8 | - | 99,8 | - |
| При съеме урожая | P | 0,75 | 77,0 | 0,50 | 27,0 |
| | R | 0,20 | 62,8 | 0,20 | 16,4 |
| | БЭ | 99,7 | - | 98,8 | - |

Условные обозначения: P – распространение болезни, R – интенсивность развития болезни, БЭ – биологическая эффективность.

В 2019 г испытание опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW также проводили на яблоне сорта Ренет Симиренко. На момент испытаний на опытном участке парша развивалась по типу тардивной эпифитотии. В контрольном варианте на начало проведения опыта было поражено более 60% листового аппарата и около трети плодов.

Учет на 5-е сутки после обработки показал, что после применения опытного образца количество пораженных листьев не изменилось, интенсивность их поражения возросла очень незначительно, и была зафиксирована высокая эффективность защиты от болезни. На 9-е сутки в варианте применения опытного образца количество пораженных листьев незначительно увеличилось, интенсивность их поражения не изменилась, и сохранилась тенденция высокоэффективного блокирования инфекции возбудителя. Учет во время съема урожая продемонстрировал высокую эффективность препарата в защите листьев от парши. Также показали, что на протяжении всего периода испытаний опытный образец успешно блокировал развитие парши на плодах (таблица 47).

Таким образом, опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытали на высоковосприимчивом к парше сорте яблони в стандартных производственных условиях: во второй половине вегетации 2019 г, при высоком уровне распространения парши на обрабатываемых деревьях; в контроле потенциал инокулюма был высокий, развитие парши носило эпифитотийный характер. Препарат с нормой расхода 4,0 л/га обеспечил высокую эффективность защиты от парши на уровне 99,1-99,8 %, при этом период защитного действия от конидиальной инфекции парши составил 9 суток.

Таблица 47 – Биологическая эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против парши яблони сорта Ренет Симиренко, 2019 г

| Учет | Показатель, % | Листья | | Плоды | |
|------------------|------------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| | | Опытный образец | Контроль | Опытный образец | Контроль |
| Через 5 суток | P | 0,50 | 68,0 | 0,25 | 39,7 |
| | R | 0,20 | 53,0 | 0,05 | 20,8 |
| | БЭ | 99,6 | - | 99,8 | - |
| Через 9 суток | P | 0,75 | 68,0 | 0,20 | 49,5 |
| | R | 0,20 | 60,8 | 0,10 | 25,3 |
| | БЭ | 99,7 | - | 99,6 | - |
| При съёме урожая | P | 1,00 | 74,0 | 0,25 | 53,0 |
| | R | 0,50 | 54,4 | 0,10 | 31,8 |
| | БЭ | 99,1 | - | 99,7 | - |

Условные обозначения: P – распространение болезни, R – интенсивность развития болезни, БЭ – биологическая эффективность.

В 2020 г действие опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали против парши, монилиальной плодовой гнили и мучнистой росы. Анализировали 3 нормы расхода препарата (1, 2, 3 л/га) при 4-кратной обработке яблони сорта Голден Делишес. В качестве эталона сравнения использовали микробиологический препарат Ризоплан на основе штамма *Pseudomonas fluorescens* AP-33.

Выявили, что защитное действие испытываемого опытного образца против парши листьев при нормах применения 2 и 3 л/га была выше эффективности эталона сравнения, примененного в норме 5 л/га (таблица 49). Аналогичные данные получили и при анализе эффективности опытного образца против парши на плодах в кроне деревьев, а также плодах съёмного урожая.

Аналогичная тенденция прослеживалась и при анализе эффективности лабораторного образца препарата против мучнистой росы и монилиальной плодовой гнили, где получили высокие результаты по защите яблони против указанных заболеваний, превосходящие показатели эталона сравнения (таблица 50).

Была получена существенная прибавка урожайности при применении опытного образца в нормах 2 и 3 л/га, в варианте с нормой применения 1 л/га урожайность существенно не отличалась от контрольных значений.

По выходу товарной продукции, представленной плодами 1-го и 2-го сорта, получили следующие показатели: 70% и 20% (1 л/га), 80% и 10,0% (2 и 3 л/га), 75% и 15% (эталон сравнения), в контроле – 77,6% и 15,2% соответственно (таблица 48).

Таблица 48 – Влияние опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW на урожайность яблони сорта Голден Делишес, 2020 г

| Вариант | Норма расхода, л/га | Кратность обработок | Урожай с 1-го дерева | | Выход плодов по сортам, % | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------|---------------------------|--------|------------|
| | | | кг | % к контролю | 1 сорт | 2 сорт | Нестандарт |
| Опытный образец | 1,0 | 4 | 10,0 | 100 | 70,0 | 20,0 | 10,0 |
| Опытный образец | 2,0 | 4 | 10,3 | 103,0 | 80,0 | 10,0 | 10,0 |
| Опытный образец | 3,0 | 4 | 10,3 | 103,0 | 80,0 | 10,0 | 10,0 |
| Ризоплан, Ж (эталон) | 5,0 | 4 | 10,2 | 102,0 | 75,0 | 15,0 | 10,0 |
| Контроль (без обработки) | - | - | 10,0 | 100 | 77,6 | 15,2 | 7,2 |

НСР_{0,5}=0,2
кг/дерево

Таким образом, проведенные испытания подтвердили результаты 2018-2019 гг., и доказали, что препарат на основе штамма *P. asplenii* 11RW имеет перспективу применения в качестве фунгицида для обработки вегетирующих растений яблони для защиты от парши, мучнистой росы и плодовой гнили. Период защитного действия опытного препарата против парши и мучнистой росы составил до 20 дней; против монилиальной плодовой гнили – до 30 дней.

Показали, что применение препарата с нормой расхода 1 л/га целесообразно для применения при низком инфекционном фоне парши, мучнистой росы и монилиоза. При умеренном или сильном развитии этих заболеваний необходимо применение препарата с нормой расхода 2-3 л/га блоком из двух-четырёх последовательных обработок.

Таблица 49 – Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против парши яблони сорта Голден Делишес, 2020 г

| Вариант | Норма расхода, л/га | Кратность обработок | Даты обработок: 24.04; 05.05; 14.05; 24.05 | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|--|-------|--------|-------|--------|-------|----------------------|-------|--------|-------|--------|-------|----------------|-------|
| | | | <i>Venturia inaequalis</i> (парша) | | | | | | | | | | | | | |
| | | | Листья кроне дерева | | | | | | Плоды в кроне дерева | | | | | | Съёмный урожай | |
| | | | 21.05. | | 13.06. | | 23.06. | | 21.05. | | 04.06. | | 23.06. | | 22.09. | |
| | | | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % |
| Опытный образец | 1,0 | 4 | 2,2 | 47,6 | 9,3 | 46,2 | 9,0 | 52,9 | 4,2 | 56,3 | 5,0 | 67,7 | 6,3 | 56,8 | 6,0 | 57,7 |
| Опытный образец | 2,0 | 4 | 1,5 | 64,3 | 8,1 | 53,2 | 8,0 | 58,1 | 3,8 | 60,4 | 4,0 | 74,2 | 5,8 | 60,3 | 5,5 | 61,3 |
| Опытный образец | 3,0 | 4 | 1,1 | 73,8 | 7,9 | 54,3 | 7,7 | 59,7 | 3,5 | 63,5 | 3,8 | 75,5 | 5,5 | 62,3 | 5,3 | 62,7 |
| Ризоплан, Ж (эталон) | 5,0 | 4 | 1,6 | 61,9 | 8,3 | 52,0 | 8,0 | 58,1 | 4,0 | 58,3 | 4,0 | 74,2 | 5,6 | 61,6 | 5,6 | 60,6 |
| Контроль (без обработки) | - | - | 4,2 | - | 17,3 | - | 19,1 | - | 9,6 | - | 15,5 | - | 14,6 | - | 14,2 | - |

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность.

Таблица 50 – Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против болезней яблони сорта Голден Делишес, 2020 г

| Вариант | Норма расхода, л/га | Кратность обработок | Даты обработок: 24.04; 05.05; 14.05; 24.05 | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---|-------|--------|-------|--------|-------|--|-------|--------|-------|--------|-------|----------------|--|
| | | | <i>Podosphaera leucotricha</i> (мучнистая роса) | | | | | | <i>Monilia fructigena</i> (плодовая гниль) | | | | | | | |
| | | | Листья в кроне дерева | | | | | | Плоды в кроне дерева | | | | | | Съёмный урожай | |
| | | | 21.05. | | 04.06. | | 23.06. | | 09.08. | | 03.09. | | 22.09. | | | |
| | | | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | | |
| Опытный образец | 1,0 | 4 | 1,2 | 73,3 | 1,4 | 63,2 | 2,1 | 64,4 | 0,5 | 66,7 | 0,5 | 66,7 | 0,5 | 68,8 | | |
| Опытный образец | 2,0 | 4 | 0,7 | 84,4 | 1,1 | 71,1 | 2,0 | 66,1 | 0,4 | 73,3 | 0,4 | 73,3 | 0,4 | 75,0 | | |
| Опытный образец | 3,0 | 4 | 0,7 | 84,4 | 1,1 | 71,1 | 2,0 | 66,1 | 0,3 | 80,0 | 0,3 | 80,0 | 0,3 | 81,3 | | |
| Ризоплан, Ж (эталон) | 5,0 | 4 | 0,8 | 82,2 | 1,2 | 68,4 | 2,0 | 66,1 | 0,6 | 60,0 | 0,6 | 60,0 | 0,6 | 62,5 | | |
| Контроль (без обработки) | - | - | 4,5 | - | 3,8 | - | 5,9 | - | 1,5 | - | 1,5 | - | 1,6 | - | | |

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность.

3.4.2.2. Испытание опытного образца препарата в защите винограда

3.4.2.2.1. Защита против серой гнили

Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в системе защиты винограда от серой гнили в течение 2-х лет в условиях республики Крым.

В 2019 г для проведения полевого испытания опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW в качестве опытного участка выбрали виноградник сорта Мерло 2014 года посадки. Варианты с двукратным применением биопрепарата с нормой расхода 1 л/га сравнивали с системой защиты хозяйства (без применения фунгицидов против серой гнили) и вариантом с применением специализированного химического фунгицида на основе ципродинила с нормой 2,6 л/га.

Через 12 суток после первой обработки в варианте с применением опытного образца препарата поражение гроздей винограда серой гнилью не наблюдали. Учет, проведенный через 5 суток после второй обработки, показал, что развитие болезни не превышало 0,3% и соответствовало по уровню варианту с однократным применением специализированного фунгицида и в два раза ниже, чем в варианте стандарта хозяйства (рисунок 12) [301].

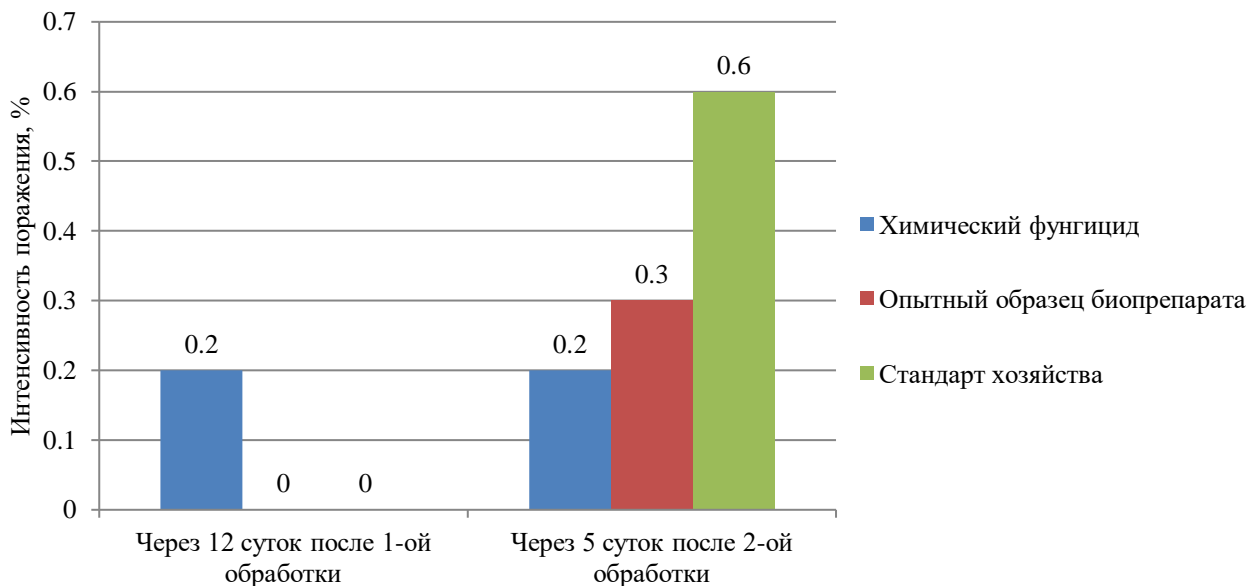


Рисунок 12 – Интенсивность поражения винограда сорта Мерло серой гнилью в различных вариантах, 2019 г.

Результаты, полученные при уборке урожая винограда, представлены в таблице 51.

Таблица 51 – Показатели урожая винограда сорта Мерло, 2019 г.

| Вариант | Средняя масса грозди, г | Количество гроздей, шт/куст | Урожай, кг/куст | Массовая концентрация сахаров, г/100 см ³ |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------|--|
| Опытный образец биопрепарата | 118,7 | 21,9 | 2,6 | 25,3 |
| Химический фунгицид | 128,1 | 22,7 | 2,9 | 26,4 |
| Стандарт хозяйства | 119,4 | 22,5 | 2,7 | 24,9 |
| НСР _{0,5} | 5,8 | 1,6 | 0,3 | 1,0 |

Учет урожая показал, что в варианте применения опытного образца препарата получили хороший кондиционный урожай винограда, который находился на одном уровне с вариантами применения химического фунгицида и системы хозяйства и составлял 2,6 кг/куст. Содержание сахаров в соке ягод винограда в варианте применения опытного образца в момент уборки составило 25,3 г/100 см³.

В 2020 г для проведения полевого испытания опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в качестве опытного участка выбрали виноградник сорта Каберне Совиньон 2005 г посадки. Для контроля серой гнили использовали четырехкратное применение с нормой расхода 1-3 л/га. В качестве эталона сравнения использовали микробиологический препарат Ризоплан.

При первом учете на 14-е сутки после первой обработки получили 100%-ю эффективность во всех вариантах при слабом развитии болезни в контроле (0,4%) (таблица 52). В дальнейшем также получили равнозначную эффективность во всех вариантах (по 69,2-68,8-62,5%) при слабом развитии болезни в контроле (1,3-1,6-2,4%). Стоит отметить, что высокая биологическая эффективность опытного образца на основе штамма *P. asplenii* 11RW против серой гнили достигалась более низкими нормами применения в сравнении с эталоном, примененным в норме 4 л/га. Период защитного действия опытного образца против серой гнили составил до 14 дней.

Масса одной грозди в вариантах применения опытного образца превышала контрольные показатели (103,8 г) и составила 109,5 г (1 л/га), 108,2 г (2 л/га), 107,9 г (3 л/га).

Урожайность, полученная в вариантах с испытываемым опытным препаратом при 3-х нормах применения, существенно не отличалась от урожайности в контроле. По массовой концентрации сахара варианты с 3-мя нормами применения опытного образца были близки: 27,1 г/100 м³ (1 л/га); 26,0 г/100 м³ (2 л/га); 26,8 г/100 м³ (3 л/га); в контроле этот показатель составил 25,9 г/100 м³.

Таблица 52 – Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против серой гнили винограда сорта Каберне Совиньон, 2020 г

| Вариант | Норма расхода, л/га | Кратность обработок | Даты обработок: 22.07; 29.07; 07.08; 14.08. | | | | | | | | Масса 1-й грозди, г | Урожай с 1-го куста | | Содержание сахара, г/100 см ³ |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|---------------------|---------------------|--------------|--|
| | | | <i>Botrytis cinerea</i> (серая гниль) | | | | | | | | | | | |
| | | | 28.08. | | 11.09. | | 25.09. | | 5.10. | | | кг | % к контролю | |
| | | | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | | | | |
| Опытный образец | 1,0 | 4 | 0,0 | 100 | 0,4 | 69,2 | 0,5 | 68,8 | 0,9 | 62,5 | 109,5 | 4,5 | 102,3 | 27,1 |
| Опытный образец | 2,0 | 4 | 0,0 | 100 | 0,4 | 69,2 | 0,5 | 68,8 | 0,9 | 62,5 | 108,2 | 4,5 | 102,3 | 26,0 |
| Опытный образец | 3,0 | 4 | 0,0 | 100 | 0,4 | 69,2 | 0,5 | 68,8 | 0,9 | 62,5 | 107,9 | 4,6 | 104,5 | 26,8 |
| Ризоплан, Ж (эталон) | 4,0 | 4 | 0,0 | 100 | 0,4 | 69,2 | 0,5 | 68,8 | 0,9 | 62,5 | 105,1 | 4,5 | 102,3 | 27,4 |
| Контроль (без обработки) | - | - | 0,4 | - | 1,3 | - | 1,6 | - | 2,4 | - | 103,8 | 4,4 | 100 | 25,9 |

НСР_{0,5}=0,3
кг/куст

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность.

3.4.2.2.2. Защита против милдью

Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW испытывали в системе защиты винограда от милдью в условиях Краснодарского края. Для проведения полевого испытания биопрепарата в 2020 г в качестве опытного участка выбрали виноградник сорта Совиньон блан 2015 г посадки. Для контроля ложной мучнистой росы использовали четырехкратное применение с нормой расхода 1-3 л/га.

Показали, что испытываемый опытней образец превышал по эффективности эталон сравнения, при этом эффективная защита против милдью винограда достигалась более низкой нормой применения (таблица 53). Период защитного действия опытного препарата против милдью составил до 10 дней.

Масса одной грозди винограда возрастала по мере увеличения нормы применения опытного образца и составила 128 г (1 л/га); 132 г (2 л/га); 138 г (3 л/га), при этом в эталоне сравнения этот показатель при норме 4 л/га составил 130 г и в контроле – 121 г.

Также получили существенную прибавку урожая при применении испытываемого лабораторного образца препарата при 3-х нормах применения: 16% (1 л/га); 20% (2 л/га) и 24% (3 л/га), что было выше эталонных показателей (12%) при урожайности в контроле 2,5 кг/куст.

3.4.2.2.3. Защита против оидиума

Опытный образец препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW также испытывали в системе защиты винограда от оидиума в условиях Краснодарского края. Для проведения полевого испытания биопрепарата в 2020 г в качестве опытного участка выбрали виноградник сорта Рислинг рейнский 2012 г посадки. Для контроля мучнистой росы использовали четырехкратное применение с нормой расхода 1-3 л/га.

Результаты выявили высокую эффективность опытного образца препарата против мучнистой росы, превышающую таковую у эталона сравнения, причем высокая активность опытного образца также достигалась значительно меньшей нормой расхода (таблица 54). Период защитного действия опытного образца против оидиума составил до 15 дней.

Масса одной грозди винограда значительно превышала контрольные и эталонные значения и составила при 3-х нормах применения: 139 г (1 л/га), 145 г (2 л/га), 137 г (3 л/га), при этом в эталоне масса грозди составила 112 г и в контроле – 110 г.

Также получили существенную прибавку урожая при применении испытываемого опытного препарата в 3-х нормах расхода: 30% (1 л/га), 40% (2 л/га) и 25% (3 л/га), что было выше эталонного показателя (20%) при урожайности в контроле 2,0 кг/куст.

Таким образом, в агроклиматических условиях Юго-западной зоны виноградарства Крыма на участках ценных сортов винограда Мерло и Каберне Совиньон, а также в условиях

Краснодарского края на виноградниках сортов Совиньон блан и Рислинг рейнский при использовании опытного препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в защите культуры от серой гнили, милдью и оидиума получили высокие значения его биологической эффективности, которые были сопоставимы с эффективностью специализированного фунгицида на основе ципродинила и превышали эффективность микробиологического препарата на основе *P. fluorescens*.

Таблица 53 – Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против милдью винограда сорта Совиньон блан, 2020 г

| Вариант | Норма расхода, л/га | Кратность обработок | Даты обработок: 02.07; 10.07; 20.07; 27.07 | | | | | | | | Масса 1-й грозди, г | Урожай с 1-го куста | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|--|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|---------------------|---------------------|--------------|
| | | | <i>Plasmopara viticola</i> (милдью) | | | | | | | | | кг | % к контролю |
| | | | Листья | | | | | | | | | | |
| | | | 20.07. | | 27.07. | | 04.08. | | 08.08. | | | | |
| | | | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | | | |
| Опытный образец | 1,0 | 4 | 2,7 | 51,8 | 3,6 | 71,7 | 7,6 | 57,5 | 10,2 | 49,8 | 128,0 | 2,9 | 116,0 |
| Опытный образец | 2,0 | 4 | 1,6 | 71,4 | 2,6 | 79,5 | 6,8 | 62,0 | 9,2 | 54,7 | 132,0 | 3,0 | 120,0 |
| Опытный образец | 3,0 | 4 | 0,8 | 85,7 | 2,0 | 84,3 | 6,5 | 63,7 | 8,7 | 57,1 | 138,0 | 3,1 | 124,0 |
| Ризоплан, Ж (эталон) | 4,0 | 4 | 2,9 | 48,2 | 3,2 | 74,8 | 7,7 | 57,0 | 11,0 | 45,8 | 130,0 | 2,8 | 112,0 |
| Контроль (без обработки) | - | - | 5,6 | - | 12,7 | - | 17,9 | - | 20,3 | - | 121,0 | 2,5 | 100 |

НСР_{0,5}=0,2 кг/куст

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность.

Таблица 54 – Эффективность опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW против оидиума винограда сорта Рислинг рейнский, 2020 г

| Вариант | Норма расхода, л/га | Кратность обработок | Даты обработок: 05.06; 15.06; 25.06; 05.07 | | | | | | | | Масса 1-й грозди, г | Урожай с 1-го куста | |
|--------------------------|---------------------|---------------------|--|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|---------------------|---------------------|--------------|
| | | | <i>Uncinula necator</i> (оидиум) | | | | | | | | | кг | % к контролю |
| | | | Гроздья | | | | | | | | | | |
| | | | 25.06. | | 05.07. | | 15.07. | | 19.07. | | | | |
| | | | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | Р, % | БЭ, % | | | |
| Опытный образец | 1,0 | 4 | 0,9 | 78,6 | 3,1 | 80,3 | 15,7 | 67,9 | 26,6 | 54,5 | 139,0 | 2,6 | 130,0 |
| Опытный образец | 2,0 | 4 | 0,0 | 100 | 2,7 | 82,8 | 11,8 | 75,9 | 24,3 | 58,5 | 145,0 | 2,8 | 140,0 |
| Опытный образец | 3,0 | 4 | 0,0 | 100 | 3,2 | 79,6 | 17,9 | 63,4 | 28,9 | 50,6 | 137,0 | 2,5 | 125,0 |
| Ризоплан, Ж (эталон) | 4,0 | 4 | 1,1 | 73,8 | 5,5 | 65,0 | 22,3 | 54,4 | 34,0 | 41,9 | 112,0 | 2,4 | 120,0 |
| Контроль (без обработки) | - | - | 4,2 | - | 15,7 | - | 48,9 | - | 58,5 | - | 110,0 | 2,0 | 100 |

НСР_{0,5}=0,3 кг/куст

Условные обозначения: Р – развитие, БЭ – биологическая эффективность.

3.4.2.3. Испытание опытного образца препарата в защите пшеницы

Испытание опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW с предпосевным применением с нормой расхода 1 л/т в сочетании с химическим протравителем Скарлет, МЭ (0,4 л/т) анализировали на семенах пшеницы сорта Алабуга на микроделянках опытного поля (Курганская область, Кетовский район, 2020 г.).

Корневая гниль пшеницы

В фазу выхода в трубку проводили мониторинг пораженности пшеницы корневой гнилью, результаты представлены в таблице 55.

Таблица 55 – Пораженность пшеницы сорта Алабуга корневой гнилью, 2020 г

| Варианты | Развитие корневой гнили (Р ₆), % | Критерий адаптивности (Ка) | Примечание |
|-----------------------------------|--|----------------------------|---------------------------|
| Контроль | 18,9 | 2,0 (-) | Минус-адаптивность |
| Скарлет | 5,6 | 3,0 (+++) | Максимальная адаптивность |
| <i>P. asplenii</i> 11RW + Скарлет | 5,8 | 3,0 (+++) | Максимальная адаптивность |

Результаты показали, что обработка семян опытным образцом в сочетании с химическим протравителем обеспечивала минимальное развитие корневой гнили пшеницы на уровне с моно-применением протравителя. Эти же варианты обеспечили и максимально высокую адаптивность растений. Растения контрольного варианта демонстрировали минус-адаптивность к корневой гнили, и в засушливых условиях вегетационного периода развитие болезни достигало 18,9%, т.е. многие растения были поражены по 3-му баллу.

Таким образом, результаты оценки развития обыкновенной корневой гнили в условиях естественной контаминации почвы пропагулами фитопатогена при испытании микробиологического препарата доказывают его высокую эффективность в отношении возбудителя корневой гнили.

Листовые инфекции пшеницы

В связи с острозасушливыми условиями вегетационного сезона 2020 года на посевах пшеницы из листовых инфекций был отмечен только пиренофороз (рисунок 13), возбудитель которого способен развиваться в жаркую и сухую погоду, хотя образование конидий, с помощью которых грибок распространяется в посевах, при этом существенно тормозится. Осадки в мае способствовали проявлению инфекции уже на всходах, но жаркая и засушливая погода июня-августа сдержала темпы распространения и развития пиренофороза на пшенице, поэтому

оценку фитосанитарной ситуации проводили однократно (на двух ярусах прикорневых листьев) в фазе выхода в трубку.



Рисунок 13 – Развитие пиренофороза листьев пшеницы на учетных площадках опыта

На контрольном варианте (семена без обработки) распространение желтой пятнистости было максимальным и варьировало в зависимости от яруса листьев от 60 до 88% (таблица 56). Прикорневые листья быстро желтели и засыхали. Степень развития заболевания достигала 13%. Это указывает на достаточно высокую восприимчивость сорта Алабуга к пиренофорозу. В варианте комбинированного применения опытного образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW распространение пиренофороза на 3 и 4 ярусах листьев относительно необработанного контроля снижалось на 28% и 32% соответственно.

В контроле степень развития пиренофороза была максимальная – от 2 до 13%. В вариантах с применением на семенах микробиологического препарата в сочетании со Скарлетом и только препарата Скарлет степень развития болезни существенно снижалась, как на третьем, так и четвертом ярусе прикорневых листьев.

Таким образом, результаты учетов показали, что изучаемый препарат, примененный в сочетании с химическим протравителем, эффективно сдерживал развитие желтой пятнистости листьев пшеницы.

Таблица 56 – Развитие пиренофороза в различных вариантах обработки семян

| Вариант | Развитие пиренофороза, % (3-й ярус листьев) | | Развитие пиренофороза, % (4-й ярус листьев) | |
|----------|--|---------------------|--|---------------------|
| | Распространение, % | Степень развития, % | Распространение, % | Степень развития, % |
| Контроль | 60,0 | 2,00 | 88,0 | 13,08 |

| | | | | |
|--------------------------------------|------|------|------|------|
| Скарлет | 40,0 | 0,72 | 84,0 | 4,16 |
| <i>P. asplenii</i> 11RW + Скарлет | 32,0 | 0,80 | 56,0 | 5,04 |

Оценка хозяйственной эффективности опытного образца препарата предусматривала определение параметров структуры урожая по вариантам опыта (таблица 57). Выявили, что комбинированная обработка опытным биопрепаратом и химическим протравителем обеспечила прибавку урожая 5,5 ц/га, тогда как применение только химического протравителя способствовало прибавке 2,1 ц/га. Результаты опыта показали, что для анализируемого опытного биопрепарата был характерен достаточно выраженный ростстимулирующий эффект, выразившийся в увеличении густоты стеблестоя, высоте растений, числа зерен в колосе и их массы. А также отмечалось улучшение стрессоустойчивости растений в условиях остро засушливого вегетационного периода. Наиболее высокий энергетический коэффициент был также характерен для обработки семян опытным биопрепаратом в сочетании с химическим протравителем.

Таблица 57 – Результаты анализа структуры урожая

| Параметры | Вариант | | |
|---|----------|---------|--------------------------------------|
| | Контроль | Скарлет | <i>P. asplenii</i> 11RW + Скарлет |
| Густота продуктивного стеблестоя, колосьев/м ² | 316 | 400 | 424 |
| Высота растений, см | 52,0 | 68,0 | 64,8 |
| Число зёрен в колосе, шт. | 29 | 30 | 32 |
| Масса 1000 зёрен, г | 30,0 | 34,1 | 35,3 |
| Биологическая урожайность, ц/га | 22,5 | 24,6 | 28,0 |
| Хозяйственная эффективность, % | - | 9,3 | 24,4 |

Таким образом, по результатам проведенных испытаний можно сделать вывод о высокой хозяйственной и биологической эффективности обработки семян пшеницы разработанным опытным образцом препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в сочетании с химическим протравителем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из различных образцов выделили более 350 культивируемых ризосферных, эпифитных и эндофитных бактериальных штаммов, ассоциированных с растениями. Созданную коллекцию систематизировали по проявлению антагонистических свойств и синтезу фитогормона ИУК. Из общего числа отобрали 25 микроорганизмов с наибольшей антимикробной активностью, среди которых наиболее активным явился ризосферный штамм 11RW, способный подавлять развитие 6 тестируемых фитопатогенов, а также продуцировать ИУК. Штамм идентифицировали как *Pseudomonas asplenii* и депонировали во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под регистрационным номером В-13395 по процедуре национального патентного депонирования. После дополнительного изучения антифунгальной активности, выявления ростстимулирующих свойств, подтверждения безопасности по отношению к растениям и теплокровным животным штамм *P. asplenii* 11RW отобрали в качестве перспективного продуцента для дальнейшего исследования.

Изучили культуральные и физиолого-биохимические свойства штамма *P. asplenii* 11RW. Выявили, что штамм обладает выраженным фунгицидным действием и способен в различной степени подавлять 106 из 108 тестируемых фитопатогенных микромицетов. Одним из механизмов антибиоза является активная продукция сидерофоров – низкомолекулярных соединений, активно связывающих железо. Помимо этого, штамм *P. asplenii* 11RW синтезирует летучие соединения, ингибирующие развитие как мицелия грибов, так и их конидий. Благодаря этим свойствам штамм обладает широким спектром подавления роста фитопатогенных грибов сельскохозяйственных, древесных и декоративных растений.

Показали ростстимулирующую активность штамма *P. asplenii* 11RW, объясняющуюся его способностью синтезировать основной фитогормон типа ауксинов, растворять неорганические фосфаты, продуцировать аммоний и летучие соединения, способствующие росту растений. Благодаря особенностям анализируемого продуцента быстро колонизировать корневую систему, показанной в условиях гнотобиологических систем, штамм также способен реализовывать функции биоконтрольного агента против различных возбудителей грибного и бактериального происхождения.

Таким образом, проанализированные свойства (синтез фитогормонов, сидерофоров, летучих метаболитов, аммония, фосфатмобилизация, а также антагонистическое и рострегуляторное действие) являются основными механизмами биологической активности штамма *P. asplenii* 11RW, позволяющими отнести его к группе PGPR.

Подобрали питательную среду и условия культивирования, обеспечивающие высокий выход бактериальной биомассы. Показали возможность длительного хранения жидкой культуры штамма без внесения стабилизирующих добавок в течение 3 лет, по истечению которого культура сохраняет титр на уровне 10^8 КОЕ/мл и не теряет антагонистических свойств.

Продемонстрировали высокую биологическую эффективность экспериментального образца препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW в полевых условиях в защите яблони, винограда и яровой пшеницы, демонстрирующую перспективность нового продукта для применения в сельском хозяйстве.

Конечный результат проведенного исследования заключается в получении стабильного при хранении препарата на основе штамма *P. asplenii* 11RW, обладающего высокой биологической активностью против возбудителей вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур, и государственной регистрации разработанного препарата под торговым названием «Биокомпозит-Про, Ж».

ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция ризосферных, эндофитных и эпифитных бактерий, ассоциированных с растениями, включающая более 350 изолятов. По результатам проведенного скрининга отобрали наиболее активный штамм 11RW, идентифицированный как *Pseudomonas asplenii*;

2. Показано, что штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW способен к продукции сидерофоров, ИУК, аммония, обладает широким спектром действия против фитопатогенных грибов и бактерий, способен к фосфатмобилизации, обладает ростстимулирующим действием, способен активно заселять корневую систему и реализовывать биоконтрольные функции. Штамм не обладает токсическим действием и безопасен для растений и теплокровных животных;

3. Предложен состав питательной среды и условия культивирования штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW с целью получения высокоэффективного антимикробного препарата. Была продемонстрирована возможность длительного хранения жидкой культуры штамма без внесения стабилизирующих добавок в течение 3 лет с сохранением антагонистических свойств;

4. Разработанный экспериментальный образец препарата на основе *Pseudomonas asplenii* 11RW показал высокую биологическую эффективность в защите яблони от возбудителей парши, мучнистой росы и монилиальной плодовой гнили; винограда от серой гнили, милдью и оидиума и пшеницы от корневых гнилей и пиренофороза в полевых условиях. Выявлено, что при низком инфекционном фоне целесообразно листовое применение препарата с нормой 1 л/га; при умеренном или сильном развитии заболеваний необходимо применение препарата с нормой расхода 2-3 л/га блоком из двух-четырех последовательных обработок;

5. По результатам проведенного исследования на основе штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW был создан микробиологический фунгицид под торговым названием «Биокомполит-Про, Ж», прошедший государственную регистрацию, получивший свидетельство о государственной регистрации пестицида №018-02-3837-1 на срок по 24.10.2032 г. и допущенный к обороту на территории Российской Федерации.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Созданная коллекция бактерий, ассоциированных с растениями, может быть использована для детального анализа их хозяйственно-полезных свойств, исследования возможности их практического применения и разработки биопрепаратов различного назначения для сельского хозяйства.

2. Разработанный фунгицид Биокомполит-Про, Ж рекомендован к применению для защиты яблони от парши, монилиальной плодовой гнили и мучнистой росы с 4-кратной обработкой в период вегетации и перед сбором урожая с нормой применения препарата 1,0-3,0 л/га и рабочей жидкости 800-1000 л/га (для сельскохозяйственного производства) и с нормой применения препарата 30 мл/10 л воды и рабочей жидкости 10 л/100 м² (для личных подсобных хозяйств).

3. Разработанный фунгицид Биокомполит-Про, Ж рекомендован к применению для защиты винограда от милдью, оидиума и серой гнили с 4-кратной обработкой в период вегетации и перед сбором урожая с нормой применения препарата 1,0-3,0 л/га и рабочей жидкости 800-1000 л/га (для сельскохозяйственного производства) и с нормой применения препарата 30 мл/10 л воды и рабочей жидкости 10 л/100 м² (для личных подсобных хозяйств).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 2,4-ДАФГ – 2,4-диацетилфлороглюцин;
- 2-ОН-РСА – 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота;
- 2-ОН-РНЗ – 2-гидроксифеназин;
- СМС – карбоксиметилцеллюлоза;
- EPS – внеклеточные полимерные вещества;
- ISR – индуцированная системная устойчивость;
- МСП – метил-акцептирующие белки хемотаксиса;
- РСА – феназин-1-карбоновая кислота;
- РСН – феназин-1-карбоксамид;
- РЕГ – полиэтиленгликоль;
- РGPR – ризобактерии, способствующие росту растений;
- РНЗ – питательный раствор для растений;
- РVP – поливинилпирролидон;
- SAR – системная приобретенная устойчивость;
- Т6SS – системы секреции типа VI;
- АБК – абсцизовая кислота;
- АК – аскорбиновая кислота;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФК – активные формы кислорода;
- АЦК – 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота;
- ГМФ – гидролизат мяса ферментрированного;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ИУК – индолил-3-уксусная кислота;
- КГА – картофельно-глюкозный агар;
- КСА – картофельно-сахарозный агар;
- ЛОС – летучие органические соединения;
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид;
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат;
- ОП₆₀₀ – оптическая плотность при 600 нм;
- ПКС – поликетидсинтазы;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;

Т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов;

ЦЛП – циклические липопептиды;

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sutton, M. Too much of a good thing / M. Sutton, O. Oenema, J. Erisman et al. // Nature. – 2011. – Vol. 472. – P. 159-161.
2. Lugtenberg, B. Plant-growth-promoting rhizobacteria / B. Lugtenberg, F. Kamilova // Annu. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 63, № 1. – P. 541-56.
3. Backer, R. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture / R. Backer, J.S. Rokem, G. Ilangumaran et al. // Front. Plant Sci. – 2018. – Vol. 9. – 1473.
4. Weller, D.M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years / D.M. Weller // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97, №2. – P. 250-256.
5. Majeed, A. *Pseudomonas* sp. AF-54 containing multiple plant beneficial traits acts as growth enhancer of *Helianthus annuus* L. under reduced fertilizer input / A. Majeed, M. Kaleem Abbasi, S. Hameed et al. // Microbiol. Res. – 2018. – Vol. 216. – P. 56-69.
6. Li, H.B. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere / H.B. Li, R.K. Singh, P. Singh et al. // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – 1268.
7. Qessaoui, R. Applications of new rhizobacteria *Pseudomonas* isolates in agroecology Via fundamental processes complementing plant growth / R. Qessaoui, R. Bouharroud, J.N. Furze et al. // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9. – 12832.
8. Ortiz-Castro, R. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence arabidopsis root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides / R. Ortiz-Castro, J. Campos-García, J. López-Bucio // J. Plant Growth Regul. – 2020. – Vol. 39. – P. 254-265.
9. Chu, T.N. *Pseudomonas* PS01 isolated from maize rhizosphere alters root system architecture and promotes plant growth / T.N. Chu, L.V. Bui, M. Hoang // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8, №4. – 471.
10. Gross, H. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. / H. Gross, J.E. Loper // Nat. Prod. Rep. – 2009. – Vol. 26, № 11. – P. 1408-1446.
11. Ma, Z. Role of phenazines and cyclic lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. CMR12a in induced systemic resistance on rice and bean / Z. Ma, G.K.H. Hua, M. Ongena, M. Höfte // Environ. Microbiol. Rep. – 2016. – Vol. 8. – P. 896-904.

12. Bossis, E. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision / E. Bossis, P. Lemanceau, X. Latour, L. Gardan // *Agronomie*. – 2000. – Vol. 20, №1. – P. 51-63.
13. Holt, J.G. Bergey's manual of determinative bacteriology / J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath et al. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. – P. 93-94.
14. Botelho, G.R., Mendonca-hagler L.C. Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops: an overview / G.R. Botelho, L.C. Mendonca-hagler // *Braz. J. Microbiol.* – 2006. – Vol.37, №4. – P. 401-416.
15. Weller, D.M. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots / D.M. Weller, B.B. Landa, O.V. Mavrodi et al. // *Plant Soil*. (Stuttg.). – 2007. – Vol. 9, №1. – P. 4-20.
16. Vieira, S. Drivers of the composition of active rhizosphere bacterial communities in temperate grasslands / S. Vieira, J. Sikorski, S. Dietz et al. // *ISME J.* – 2020. – Vol. 14, №2. – P. 463-475.
17. Zboralski, A. Rhizosphere colonization by plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: thriving in a heterogeneous and challenging environment / A. Zboralski, A. Biessy, M. Filion // *Advances in PGPR research* / H.B. Singh (Ed.). – Oxfordshire, UK: CAB International, 2017. – P. 197-217.
18. Biessy, A. Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics / A. Biessy, M. Filion // *Environ. Microbiol.* – 2018. – Vol. 20, №11. – P.3905-3917.
19. Haas, D. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads / D. Haas, G. Défago // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3, № 4. – P.307-319.
20. Sosa, M.F. A black-pigmented pseudomonad isolate with antibacterial activity against phyllospheric pathogens / M.F. Sosa, P. Sobrero, C. Valverde, B. Agarar // *Rhizosphere*. – 2020. – Vol. 15: 100207.
21. Thomashow, L. Microbial Control of Root-Pathogenic Fungi and Oomycetes / L. Thomashow, P.A.H.M. Bakker // *Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* / B. Lugtenberg (Ed.). – Switzerland: Springer International Publishing; 2015. – P. 165-173.
22. Robin, A. Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition / A. Robin, G. Vansuyt, P. Hinsinger et al. // *Advances in agronomy* / D.L. Sparks (Ed.). – London, UK: Academic Press, 2008. – Vol. 99. – P. 183-225.
23. Richardson, A.E. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms / A.E. Richardson, J.-M. Barea, A.M. McNeill, C. Prigent-Combaret // *Plant Soil*. – 2009. – Vol. 321. – P. 305-339.

24. Pieterse, C.M.J. Induced systemic resistance by beneficial microbes / C.M.J. Pieterse, C. Zamioudis, R.L. Berendsen et al. // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2014. – Vol. 52, №1. – P. 347-375.
26. Sampedro, I. *Pseudomonas* chemotaxis / I. Sampedro, R.E. Parales, T. Krell, J.E. Hill // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2015. – Vol. 39, №1. – P. 17-46.
27. Pliego, C. Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae / C. Pliego, S. de Weert, G. Lamers et al. // *Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 10, №12. – P. 3295-3304.
28. Wadhams, G.H. Making sense of it all: bacterial chemotaxis / G.H. Wadhams, J.P. Armitage // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 1024-1037.
29. Molina, L. *Pseudomonas putida* KT2440 metabolism undergoes sequential modifications during exponential growth in a complete medium as compounds are gradually consumed / L. Molina, R.L. Rosa, J. Nogales, F. Rojo // *Environ. Microbiol.* – 2019. – Vol. 21, № 7. – P. 2375-2390.
30. Lacal, J. Sensing of environmental signals: classification of chemoreceptors according to the size of their ligand binding regions / J. Lacal, C. García-Fontana, F. Muñoz-Martínez et al. // *Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 12, № 11. – P. 2873-2884.
31. Parales, R.E. *Pseudomonas putida* F1 has multiple chemoreceptors with overlapping specificity for organic acids / R.E. Parales, R.A. Luu, G.Y. Chen et al. // *Microbiology.* – 2013. – Vol. 159. – P. 1086-1096.
32. Muriel, C. Chemotactic motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions / C. Muriel, B. Jalvo, M. Redondo-Nieto et al. // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, №7. – e0132242.
33. López-Farfán, D. Concentration dependent effect of plant root exudates on the chemosensory systems of *Pseudomonas putida* KT2440 / D. López-Farfán, J.A. Reyes-Darias, M.A. Matilla, T. Krell // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – 78.
34. Oku, S. Identification of *Pseudomonas fluorescens* chemotaxis sensory proteins for malate, succinate, and fumarate, and their involvement in root colonization / S. Oku, A. Komatsu, Y. Nakashimada et al. // *Microbes Environ.* – 2014. – Vol. 29, №4. – P.413-419.
35. de Weert, S. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* / S. de Weert, H. Vermeiren, I.H.M. Mulders et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2002. – Vol. 15, №11. – P. 1173-1180.
36. Capdevila, S. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization / S. Capdevila, F.M. Martínez-Granero, M. Sánchez-Contreras et al. // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150. – P.3889-3897.

37. Oku, S. Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization / S. Oku, A. Komatsu, T. Tajima et al. // *Microbes Environ.* – 2012. – Vol. 27, №4. – P. 462-469.
38. Gao, X. Enhancing the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate metabolic rate of *Pseudomonas* sp. UW4 intensifies chemotactic rhizocompetence / X. Gao, T. Li, W. Liu et al. // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8. – 71.
39. Blaha, D. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography / D. Blaha, C. Prigent-Combaret, M.S. Mirza, Y. Moënne-Loccoz // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2006. – Vol. 56, №3. – P. 455-470.
40. Li, T. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate: a novel and strong chemoattractant for the plant beneficial rhizobacterium *Pseudomonas putida* UW4 / T. Li, J. Zhang, C. Shen et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2019. – Vol. 32, № 6. – P. 750-759.
41. Flemming, H.-C. The biofilm matrix / H.-C. Flemming, J. Wingender // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 8, №9. – P. 623-633.
42. Castiblanco, L.F. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria: molecular regulation of biofilm formation / L.F. Castiblanco, G.W. Sundin // *J. Integr. Plant Biol.* – 2016. – Vol. 58, №4. – P. 362-372.
43. Monds, R.D. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review / R.D. Monds, G.A. O'Toole // *Trends Microbiol.* – 2009. – Vol. 17, №2. – P. 73-87.
44. Hinsa, S.M. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein / S.M. Hinsa, M. Espinosa-Urgel, J.L. Ramos, G.A. O'Toole // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 49, №4. – P. 905-918.
45. Yousef-Coronado, F. Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida* / F. Yousef-Coronado, M.L. Travieso, M. Espinosa-Urgel // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – Vol. 288, №1. – P. 118-124.
46. Martínez-Gil, M. LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture / M. Martínez-Gil, F. Yousef-Coronado, M. Espinosa-Urgel // *Mol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 77, №3. – P. 549-561.
47. Collins, A.J. MapA, a second large RTX adhesion conserved across the Pseudomonads, contributes to biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* / A.J. Collins, A.B. Pastora, T.J. Smith, G.A. O'Toole // *J. Bacteriol.* – 2020. – Vol. 202, №18. – e00277-20.

48. Ansari, F.A. Factors affecting biofilm formation in in vitro and in the rhizosphere / F.A. Ansari, H. Jafri, I. Ahmad, H.H. Abulreesh // *Biofilms in plant and soil health* / I. Ahmad, F.M. Husain (Eds.) – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. – P. 275-290.
49. Nielsen, L. Cell-cell and cell-surface interactions mediated by cellulose and a novel exopolysaccharide contribute to *Pseudomonas putida* biofilm formation and fitness under water-limiting conditions / L. Nielsen, X. Li, L.J. Halverson // *Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 13, №5. – P. 1342-1356.
50. Nilsson, M. Influence of putative exopolysaccharide genes on *Pseudomonas putida* KT2440 biofilm stability / M. Nilsson, W.-C. Chiang, M. Fazli et al. // *Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 13, №5. – P. 1357-1369.
51. Marshall, D.C. Alginate genes are required for optimal soil colonization and persistence by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 / D.C. Marshall, B.E. Arruda, M.W. Silby // *Access Microbiol.* – 2019. – Vol. 1, №3. – e000021.
52. Ueda, A. Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species / A. Ueda, H. Saneoka // *Curr. Microbiol.* – 2015. – Vol. 70, №4. – P. 506-513.
53. Wu, L. The (p)ppGpp-mediated stringent response regulatory system globally inhibits primary metabolism and activates secondary metabolism in *Pseudomonas protegens* H78 / L. Wu, Z. Wang, Y. Guan et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 104, №7. – P. 3061-3079.
54. Colvin, K.M. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix / K.M. Colvin, Y. Irie, C.S. Tart et al. // *Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 14, №8. – P. 1913-1928.
55. Franklin, M.J. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, pel, and Psl / M.J. Franklin, D.E. Nivens, J.T. Weadge, P.L. Howell // *Front. Microbiol.* – 2011. – Vol. 2. – P. 167.
56. Whitchurch, C.B. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation / C.B. Whitchurch, T. Tolker-Nielsen, P.C. Ragas, J.S. Mattick // *Science.* – 2002. – Vol. 295, №5559. – P. 1487.
57. Sarkar, S. Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA / S. Sarkar // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 104, №15. – P. 6549-6564.
58. Das, T. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development: the roles of eDNA in the bacterial biofilm development / T. Das, S. Sehar, M. Manefield // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2013. – Vol. 5, №6. – P. 778-786.
59. Fuqua, C. Passing the baton between laps: adhesion and cohesion in *Pseudomonas putida* biofilms / C. Fuqua // *Mol. Microbiol.* – 2010. – Vol. 77, №3. – P. 533-536.

60. Chin-A-Woeng, T.F.C. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy / T.F.C. Chin-A-Woeng, W. de Priester, A.J. van der Bij, B.J.J. Lugtenberg // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1997. – Vol. 10, №1. – P. 79-86.
61. Walker, T.S. Root exudation and rhizosphere biology / T.S. Walker, H.P. Bais, E. Grotewold, J.M. Vivanco // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 132, №1. – P. 44-51.
62. Gjermansen, M. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms / M. Gjermansen, P. Ragas, C. Sternberg et al. // *Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 7, №6. – P. 894-904.
63. Petrova, O.E. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion / O.E. Petrova, K. Sauer // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2016. – Vol. 30. – P. 67-78.
64. Badri, D.V. Regulation and function of root exudates / D.V. Badri, J.M. Vivanco // *Plant Cell Environ.* – 2009. – Vol. 32, №6. – P. 666-681.
65. Barahona, E. Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces / E. Barahona, A. Navazo, F. Yousef-Coronado et al. // *Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 12, №12. – P. 3185-3195.
66. Piromyou, P. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand / P. Piromyou, B. Buranabanyat, P. Tantasawat et al. // *Europ. J. Soil Biol.* – 2011. – Vol. 47, №1. – P. 44-54.
67. Razaq, M. Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono* / M. Razaq, P. Zhang, H.L. Shen, Salahuddin, // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, №2. – e0171321.
68. Novo, L.A. Plant growth-promoting rhizobacteria-assisted phytoremediation of mine soils / L.A. Novo, P.M. Castro, P. Alvarenga, E.F. da Silva // *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* / M.N.V. Prasad, P.J. de Campos Favas, S.K. Maiti (Eds.). – Amsterdam: Elsevier Inc., 2018. – P. 281-295.
69. Lobo, C.B. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies / C.B. Lobo, M.S. Juárez Tomás, E. Viruel et al. // *Microbiol. Res.* – 2019. – Vol. 219. – P. 12-25.
70. Han, Y. Characteristics of plant growth-promoting rhizobacteria SCPG-7 and its effect on the growth of *Capsicum annuum* L. / Y. Han, S. Liu, F. Chen et al. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2021. – Vol. 28, №9. – P. 11323-11332.
71. Goswami, D. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review / D. Goswami, J.N. Thakker, P.C. Dhandhukia // *Cogent Food Agric.* – 2016. – Vol. 2, №1. – 1127500.

72. Khan, N. Impacts of plant growth promoters and plant growth regulators on rainfed agriculture / N. Khan, A. Bano, M. Babar // PloS One. – 2020. – Vol. 15, №4. – e0231426.
73. Ortiz-Castro, R. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants / R. Ortiz-Castro, C. Díaz-Pérez, M. Martínez-Trujillo et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – Vol. 108, №17. – P. 7253-7258.
74. Leveau, J.H. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 / J.H. Leveau, S.E. Lindow // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, №5. – P. 2365-2371.
75. Singh, R.P. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants / R.P. Singh, G.M. Shelke, A. Kumar, P.N. Jha // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 937.
76. Gamalero, E. Bacterial modulation of plant ethylene levels / E. Gamalero, B.R. Glick // Plant Physiol. – 2015. – Vol. 169, №1. – P. 13-22.
77. Gupta, S. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in french bean (*Phaseolus vulgaris*) plants / S. Gupta, S. Pandey // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – 1506.
78. Gontia-Mishra, I. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress / I. Gontia-Mishra, S. Sasidharan, S. Tiwari // Biotechnol. Lett. – 2014. – Vol. 36, №5. – P. 889-898.
79. Contesto, C. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria / C. Contesto, G. Desbrosses, C. Lefoulon et al. // Plant Sci. – 2008. – Vol. 175, №1-2. – P. 178-189.
80. Schaller, G.E. Cytokinin and the cell cycle / G.E. Schaller, I.H. Street, J.J. Kieber // Curr. Opin. Plant Biol. – 2014. – Vol. 21. – P. 7-15.
81. Schaller, G.E. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development / G.E. Schaller, A. Bishopp, J.J. Kieber // Plant Cell. – 2015. – Vol. 27, №1. – P. 44-63.
82. Cortleven, A. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin / A. Cortleven, T. Schmulling // J. Exp. Bot. – 2015. – Vol. 66, №16. – P. 4999-5013.
83. Grosskinsky, D.K. Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling / D.K. Grosskinsky, M. Naseem, U.R. Abdelmohsen et al. // Plant Physiol. – 2011. – Vol. 157, №2. – P. 815-830.
84. O'Brien, J.A. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses / J.A. O'Brien, E. Benkova // Front. Plant Sci. – 2013. – Vol. 4. – 451.

85. Kudoyarova, G. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses / G. Kudoyarova, T. Arkhipova, T. Korshunova et al. // *Front. Plant Sci.* – 2019. – Vol. 10. – 1368.
86. Pallai, R. Phytohormone production and colonization of canola (*Brassica napus* L.) roots by *Pseudomonas fluorescens* 6-8 under gnotobiotic conditions / R. Pallai, R.K. Hynes, B. Verma, L.M. Nelson // *Can. J. Microbiol.* – 2012. – Vol. 58, №2. – P. 170-178.
87. Grosskinsky, D.K. Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis / D.K. Grosskinsky, R. Tafner, M.V. Moreno et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – 23310.
88. Sah, S.K. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants / S.K. Sah, K.R. Reddy, J. Li. // *Front. Plant Sci.* – 2016. – Vol. 7. – 571.
89. Cohen, A.C. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *A. thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels / A.C. Cohen, R. Bottini, M. Pontin et al. // *Physiol. Plant.* – 2015. – Vol. 153, №1. – P. 79-90.
90. Salomon, M.V. Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine / M.V. Salomon, R. Bottini, G.A. de Souza Filho et al. // *Physiol. Plant.* – 2014. – Vol. 151, №4. – P. 359-374.
91. Dodd, I.C. Rhizobacterial mediation of plant hormone status / I.C. Dodd, N.Y. Zinovkina, V.I. Safronova, A.A. Belimov // *Ann. Appl. Biol.* – 2010. – Vol. 157, №3. – P. 361-379.
92. Sgroy, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera* / V. Sgroy, F. Cassan, O. Masciarelli et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 85, №2. – P. 371-381.
93. Van der Ent, S. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes / S. Van der Ent, S.C. Van Wees, C.M. Pieterse // *Phytochemistry.* – 2009. – Vol. 70, №13-14. – P. 1581-1588.
94. Carlson, R. Rhizobacteria-induced systemic tolerance against drought stress in *Sorghum bicolor* (L.) Moench / R. Carlson, F. Tugizimana, P.A. Steenkamp, P. A. et al. // *Microbiol. Res.* – 2020. – Vol. 232. – 126388.
95. Singh, U.P. Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*) / U.P. Singh, B.K. Sarma, D.P. Singh // *Curr. Microbiol.* – 2003. – Vol. 46, №2. – P. 131-140.

96. Srivastava, S. Gene expression profiling through microarray analysis in *A. thaliana* colonized by *Pseudomonas putida* MTCC5279, a plant growth promoting rhizobacterium / S. Srivastava, V. Chaudhry, A. Mishra et al. // *Plant Signal. Behav.* – 2012. – Vol. 7, №2. – P. 235-245.
97. Gimenez-Ibanez, S. How microbes twist jasmonate signaling around their little fingers / S. Gimenez-Ibanez, A. Chini, R. Solano // *Plants (Basel)*. – 2016. – Vol. 5, №1. – 9.
98. Karmegham, N. Characterization of antifungal metabolite phenazine from rice rhizosphere fluorescent pseudomonads (FPs) and their effect on sheath blight of rice / N. Karmegham, S. Vellasamy, B. Natesan et al. // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 27, №12. – P. 3313-3326.
99. Jaaffar, A.K.M. Sensitivity of *Rhizoctonia* isolates to Phenazine-1-carboxylic acid and biological control by Phenazine-producing *Pseudomonas* spp. / A.K.M. Jaaffar, J.A. Parejko, T.C. Paulitz // *Phytopathology*. – 2017. – Vol. 107, №6. – P. 692-703.
100. Zhou, L. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide / L. Zhou, H.X. Jiang, S. Sun et al. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 32, №3. – 50.
101. Zhang, Y. Complete genome sequence of *Pseudomonas parafulva* PRS09-11288, a biocontrol strain produces the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid / Y. Zhang, P. Chen, G. Ye et al. // *Curr. Microbiol.* – 2019. – Vol. 76, №9. – P. 1087-1091.
102. De Vrieze, M. Linking comparative genomics of nine potato-associated *Pseudomonas* isolates with their differing biocontrol potential against late blight / M. De Vrieze, A.R. Varadarajan, K. Schneeberger et al. // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – 857.
103. Morrison, C.K. Phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* LBUM636 alters *Phytophthora infestans* growth and late blight development / C.K. Morrison, T. Arseneault, A. Novinscak, M. Filion // *Phytopathology*. – 2017. – Vol. 107, №3. – P. 273-279.
104. Pierson 3rd, L.S. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes / L.S. Pierson 3rd, E.A. Pierson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86, №6. – P. 1659-1670.
105. Lau, G.W. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection / G.W. Lau, D.J. Hassett, H. Ran, F. Kong // *Trends Mol. Med.* – 2004. – Vol. 10, №12. – P. 599-606.
106. Pierson 3rd, L.S. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. / L.S. Pierson 3rd, E.A. Pierson // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86, №6. – P. 1659-1670.
107. Kang, B.R. Inhibition of seed germination and induction of systemic disease resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6 requires phenazine production regulated by the global regulator, *gacS* / B.R. Kang, S.-H. Han, R.E. Zdor et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 17, №4. – P. 586-593.

108. Mazzola, M. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats / M. Mazzola, R.J. Cook, L.S. Thomashow et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1992. – Vol. 58, №8. – P. 2616-2624.
109. Yu, J.M. Effect of producing different phenazines on bacterial fitness and biological control in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 / J.M. Yu, D. Wang, L.S. Pierson 3rd, E.A. Pierson // *Plant Pathol. J.* – 2018. – Vol. 34, №1. – P. 44-58.
110. Maddula, V.S.R.K. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition / V.S.R.K. Maddula, E.A. Pierson, L.S. Pierson 3rd // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, №8. – P. 2759-2766.
111. LeTourneau, M.K. Phenazine-1-carboxylic acid and soil moisture influence biofilm development and turnover of rhizobacterial biomass on wheat root surfaces / M.K. LeTourneau, M.J. Marshall, J.B. Cliff et al. // *Environ. Microbiol.* – 2018. – Vol. 20, №6. – P. 2178-2194.
112. Wang, D. The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 / D. Wang, J.M. Yu, R.J. Dorosky et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – e0148003.
113. Wang, Y. Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydr)oxides and molecular oxygen / Y. Wang, D.K. Newman // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 42, №7. – P. 2380-2386.
114. Geudens, N. Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp. – biological swiss-army knives / N. Geudens, J.C. Martins // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – 1867.
115. Götze, S. Structure, properties, and biological functions of nonribosomal lipopeptides from pseudomonads / S. Götze, P. Stallforth // *Nat. Prod. Rep.* – 2020. – Vol. 37, №1. – P. 29-54.
116. Raaijmakers, J.M. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation / J.M. Raaijmakers, I. de Bruijn, M.J.D. de Kock // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2006. – Vol. 19, №7. – P. 699-710.
117. Massetolide, A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* / I. de Bruijn, M.J.D. de Kock, P. de Waard et al. // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol.190, №8. – P. 2777-2789.
118. Bonnichsen, L. Lipopeptide biosurfactant viscosin enhances dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms / L. Bonnichsen, N.B. Svenningsen, M. Rybtke et al. // *Microbiology.* – 2015. – Vol. 161: 2289.
119. Kearns, D.B. A field guide to bacterial swarming motility / D.B. Kearns // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 8, №9. – P. 634-644.
120. Bender, C.L. Polyketide production by plant-associated pseudomonads / C.L. Bender, V. Rangaswamy, J. Loper // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 175-196.

121. Troppens, D.M. Genomewide investigation of cellular targets and mode of action of the antifungal bacterial metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Saccharomyces cerevisiae* / D.M. Troppens, R.I. Dmitriev, D.B. Papkovsky // FEMS Yeast Res. – 2013. – Vol. 13, №3. – P. 322-334.
122. Maurhofer, M. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity / M. Maurhofer, C. Keel, U. Schnider et al. // Phytopathology. – 1992. – Vol. 82. – P. 190-195.
123. Nowak-Thompson, B. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 / B. Nowak-Thompson, N. Chaney, J.S. Wing et al. // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181, №7. – P. 2166-2174.
124. Bangera, M.G. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 / M.G. Bangera, L.S. Thomashow // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181, №10. – P. 3155-3163.
125. El-Sayed, A.K. Characterization of the mupirocin biosynthesis gene cluster from *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586 / A.K. El-Sayed, J. Hothersall, S.M. Cooper et al. // Chem. Biol. – 2003. – Vol. 10, №5. – P. 419-430.
126. Connolly, J.A. Defining the genes for the final steps in biosynthesis of the complex polyketide antibiotic mupirocin by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB10586 / J.A. Connolly, A. Wilson, M. Macioszek et al. // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9, №1. – 1542.
127. Yan, Q. Novel mechanism of metabolic coregulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens* / Q. Yan, B. Philmus, J.H. Chang, J.E. Loper // Elife. – 2017. – Vol. 6. – e22835.
128. Ghequire, M.G.K. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas* / M.G.K. Ghequire, R. De Mot // FEMS Microbiol. Rev. – 2014. – Vol. 38, №4. – P. 523-568.
129. Li, W. Promysalin, a salicylate-containing *Pseudomonas putida* antibiotic, promotes surface colonization and selectively targets other *Pseudomonas* / W. Li, P. Estrada-de los Santos, S. Matthijs et al. // Chem. Biol. – 2011. – Vol. 18, №10. – P. 1320-1330.
130. Bruce, J.B. Bacteriocins and the assembly of natural *Pseudomonas fluorescens* populations / J.B. Bruce, S.A. West, A.S. Griffin // J. Evol. Biol. – 2017. – Vol. 30, №2. – P. 352-360.
131. Jacob, F. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea* / F. Jacob // Ann. Inst. Pasteur (Paris). – 1954. – Vol. 86, №2. – P. 149-160.
132. Chavan, M.A. Molecular evolution of bacteriocins in gram-negative bacteria / M.A. Chavan, M.A. Riley // Bacteriocins: Ecology and Evolution / M.A. Chavan, M.A. Riley (Eds.). – Berlin, Heidelberg, Germany: Springer; 2007. – P. 19-43.

133. Silverman, J.M. Structure and regulation of the Type VI secretion system / J.M. Silverman, Y.R. Brunet, E. Cascales, J.D. Mougous // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2012. – Vol. 66, №1. – P. 453-472.
134. Bernal, P. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria: T6SS in phytobacteria / P. Bernal, M.A. Llamas, A. Filloux // *Environ. Microbiol.* – 2018. – Vol. 20, №1. – P. 1-15.
135. Biessy, A. Diversity of phytobeneficial traits revealed by whole-genome analysis of worldwide-isolated phenazine-producing *Pseudomonas* spp. / A. Biessy, A. Novinscak, J. Blom et al. // *Environ. Microbiol.* – 2019. – Vol. 21, №1. – P. 437-455.
136. Bernal, P. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens / P. Bernal, L.P. Allsopp, A. Filloux, M.A. Llamas // *ISME J.* – 2017. – Vol. 11, №4. – P. 972-987.
137. Mosquito, S. In planta colonization and role of T6SS in two rice *Kosakonia* endophytes / S. Mosquito, I. Bertani, D. Licastro et al. // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2020. – Vol. 33, №2. – P. 349-363.
138. Chen, W.-J. Involvement of type VI secretion system in secretion of iron chelator pyoverdine in *Pseudomonas taiwanensis* / W.-J. Chen, T.-Y. Kuo, F.-C. Hsieh et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6, №1. – P. 32950.
139. Liu, N. Synthesis of naturally occurring tropones and tropolones / N. Liu, W. Song, C.M. Schienebeck et al. // *Tetrahedron.* – 2014. – Vol. 70, №49. – P. 9281-9305.
140. Jiang, Z. 7-Hydroxytropolone produced and utilized as an iron-scavenger by *Pseudomonas donghuensis* / Z. Jiang, M. Chen, X. Yu, Z. Xie // *Biometals.* – 2016. – Vol. 29, №5. – P. 817-826.
141. Muzio, F.M. 7-hydroxytropolone is the main metabolite responsible for the fungal antagonism of *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6 / F.M. Muzio, B.C. Agaras, M. Masi et al. // *Environ. Microbiol.* – 2020. – Vol. 22, №7. – P. 2550-2563.
142. Guo, H. Tropolone natural products / H. Guo, D. Roman, C. Beemelmans // *Nat. Prod. Rep.* – 2019. – Vol. 36, №8. – P. 1137-1155.
143. Colombo, C. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes / C. Colombo, G. Palumbo, J.-Z. He et al. // *J. Soils Sediments.* – 2014. – Vol. 14, №3. – P. 538-548.
144. Wandersman, C. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores / C. Wandersman, P. Delepelaire // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2004. – Vol. 58, №1. – P. 611-647.
145. Bashan, Y. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculants technology: formulations and practical perspectives (1998-2013) (a marschner review) / Y. Bashan, L.E. De-Bashan, S.R. Prabhu, J.P. Hernandez // *Plant Soil.* – 2014. – Vol. 378. – P. 1-33.

146. Ghavami, N. Study the effects of siderophore-producing bacteria on zinc and phosphorous nutrition of canola and maize plants / N. Ghavami, H.A. Alikhani, A.A. Pourbabae, H. Besharati // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* – 2016. – Vol. 47, №12. – P. 1517-1527.
147. Grobelak, A. Bacterial siderophores promote plant growth: screening of catechol and hydroxamate siderophores / A. Grobelak, J. Hiller // *Int. J. Phytoremediation.* – 2017. – Vol. 19, №9. – P. 825-833.
148. El-Nahrawy, S. Biochemical traits of *Bacillus subtilis* MF497446: its implications on the development of cowpea under cadmium stress and ensuring food safety / S. El-Nahrawy, N. Elhawat, T. Alshaal // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2019. – Vol. 180. – P. 384-395.
149. Sinha, A.K. Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: a microcosm study / A.K. Sinha, B.V. Parli // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 2020. – Vol. 524: 151290.
150. Saha, M. Microbial siderophores and their potential applications: a review / M. Saha, S. Sarkar, B. Sarkar et al. // *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* – 2016. – Vol. 23, №5. – P. 3984-3999.
151. Meyer, J-M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species / J.-M. Meyer // *Arch. Microbiol.* – 2000. – Vol. 174, №3. – P. 135-142.
152. Garrido-Sanz, D. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex / D. Garrido-Sanz, J.P. Meier-Kolthoff, M. Göker et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – e0150183.
153. Loper, J.E. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions / J.E. Loper, K.A. Hassan, D.V. Mavrodi et al. // *PLoS Genet.* – 2012. – Vol. 8. – e1002784.
154. Ross-Gillespie, A. Evolutionary dynamics of interlinked public goods traits: an experimental study of siderophore production in *Pseudomonas aeruginosa* / A. Ross-Gillespie, Z. Dumas, R. Kümmerli // *J. Evol. Biol.* – 2015. – Vol. 28, №1. – P. 29-39.
155. Wandersman, C. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores / C. Wandersman, P. Delepelaire // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2004. – Vol. 58, №1. – P. 611-647.
156. Berti, A.D. Analysis of achromobactin biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a / A.D. Berti, M.G. Thomas // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191, №14. – P. 4594-4604.
157. Cornelis, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads / P. Cornelis // *App. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86, №6. – P. 1637-1645.
158. Cornelis, P. A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads / P. Cornelis, J. Bodilis // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2009. – Vol. 1, №4. – P. 256-262.

159. Imperi, F. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa* / Imperi F, Tiburzi F, Visca P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106, №48. – P. 20440-20445.
160. Raaijmakers, J.M. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. / J.M. Raaijmakers, L.V.D. Sluis, P.A.H.M. Bakker et al. // Can. J. Microbiol. – 1995. – Vol. 41, №2. – P. 126-135.
161. Hartney, S.L. TonB-dependent outer-membrane proteins and siderophore utilization in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 / S.L. Hartney, S. Mazurier, T.A. Kidarsa et al. // Biometals. – 2011. – Vol. 24, №2. – P. 193-213.
162. Prasad, M.N. Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions / M.N. Prasad, H. Freitas, S. Fraenzle et al. // Environ. Pollut. – 2010. – Vol. 158, №1. – P. 18-23.
163. Grobelak, A. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth / A. Grobelak, A. Napora, M. Kacprzak // Ecol. Engineer. – 2015. – Vol. 84. – P. 22-28.
164. Vejan, P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-a review / P. Vejan, R. Abdullah, T. Khadiran et al. // Molecules. – 2016. – Vol. 21, №5. – E573.
165. Ma, R. Identification and genomic analysis of antifungal property of a tomato root endophyte *Pseudomonas* sp. p21 / R. Ma, Y. Cao, Z. Cheng et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2017. – Vol. 110, №3. – P. 387-397.
166. McRose, D.L. Multiple siderophores: bug or feature? / D.L. McRose, M.R. Seyedsayamdost, F.M.M. Morel // J. Biol. Inorg. Chem. – 2018. – Vol. 23, №7. – P. 983-993.
167. Kraepiel, A.M.L. Multiple roles of siderophores in free-living nitrogen-fixing bacteria / A.M.L. Kraepiel, J.P. Bellenger, T. Wichard, F.M.M. Morel // Biometals. – 2009. – Vol. 22, №4. – P. 573-581.
168. Johnstone. T.C. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores / T.C. Johnstone, E.M. Nolan // Dalton Trans. – 2015. – Vol. 44, №14. – P. 6320-6339.
169. Wichard, T. Catechol siderophores control tungsten uptake and toxicity in the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii* / T. Wichard, J.P. Bellenger, A. Loison, A.M.L. Kraepiel // Environ. Sci. Technol. – 2008. – Vol. 42, №7. – P. 2408-2413.
170. Kloepper, J.W. Enhancing plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria / J.W. Kloepper, J. Leong, M. Teintze, M.N. Schroth // Nature. – 1980. – Vol. 286. – P. 885-886.
171. Gupta, C.P. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas* / C.P. Gupta, R.C. Dubey, D.K. Maheshwari // Biol. Fertil. Soils. – 2002. – Vol. 35. – P. 399-405.

172. Yu, S. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum* / S. Yu, C. Teng, J. Liang et al. // J. Microbiol. – 2017. – Vol. 55, №11. – P. 877-884.
173. Mohammed, A.F. Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* using *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of tomato plants / A.F. Mohammed, A.R. Oloyede, A.O. Odeseye // Arch. Phytopathol. Plant Protect. – 2020. – Vol. 53, №1-2. – P. 1-16.
174. Michavila, G. *Pseudomonas protegens* CS1 from the lemon phyllosphere as a candidate for citrus canker biocontrol agent / G. Michavila, C. Adler, P.R. De Gregorio et al. // Plant Biol. (Stuttg.). – 2017. – Vol. 19, №4. – P. 608-617.
175. Santos Kron, A. *Pseudomonas orientalis* F9 Pyoverdine, Safracin, and Phenazine Mutants Remain Effective Antagonists against *Erwinia amylovora* in apple flowers / A. Santos Kron, V. Zengerer, M. Bieri et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2020. – Vol. 86, №8. – e02620-19.
176. Ruiz, J.A. Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5 / J.A. Ruiz, E.M. Bernar, K. Jung // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, №1. – e0117040.
177. Kumar, A. Does a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability? / A. Kumar, I. Bahadur, B. Maurya et al. // J. Pure Appl. Microbiol. – 2015. – Vol. 9, №1. – P. 715-724.
178. Ellis, R.J. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity / R.J. Ellis, T.M. Timms-Wilson, M.J. Bailey // Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 2, № 3. – P. 274-284.
179. Ramette, A. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability / A. Ramette, M. Frapolli, G. Drefago, Y. Moënné-Loccoz // Mol. Plant Microbe Interact. – 2003. – Vol. 16, №6. – P. 525-535.
180. Knowles, C.J. Microorganisms and cyanide / C. J. Knowles // Bacteriol. Rev. – 1976. – Vol. 40, №3. – P. 652-680.
181. Blumer, C. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis / C. Blumer, D. Haas // Arch. Microbiol. – 2000. – Vol. 173, №3. – P. 170-177.
182. Laville, J. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco / J. Laville, C. Voisard, C. Keel et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89, №5. – P. 1562-1566.
183. Voisard, C. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions / C. Voisard, C. Keel, D. Haas, G. Drefago // EMBO J. – 1989. – Vol. 8. – P. 351-358.

184. Flaishman, M.A. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida* / M.A. Flaishman, Z. Eyal, A. Zilberstein et al. // Mol. Plant Microbe Interact. – 1996. – Vol. 9, №7. – P. 642-645.
185. Rijavec, T. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate / Rijavec T., Lapanje A. // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – 1785.
186. Schippers, B. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions / B. Schippers, A.W. Bakker, P.A.H.M. Bakker, R. van Peer // Plant Soil. – 1990. – Vol. 129, №1. – P. 75-83.
187. O'Sullivan, D.J. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens / D.J. O'Sullivan, F. O'Gara // Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 56, №4. – P. 662-676.
188. Alström, S. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition / S. Alström, R.G. Burns // Biol.Fertil. Soils. – 1989. – Vol. 7, №3. – P. 232-238.
189. Kremer, R.J. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth / R.J. Kremer, T. Souissi // Curr. Microbiol. – 2001. – Vol. 43, №3. – P. 182-186.
190. Insam, H. Volatile organic compounds (VOCs) in soils / H. Insam, M.S. Seewald // Biol.Fertil. Soils. – 2010. – Vol. 46, №3. – P. 199-213.
191. Vaishnav, A. Characterization of bacterial volatiles and their impact on plant health under abiotic stress / A. Vaishnav, A. Varma, N. Tuteja, D.K. Choudhary // Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agro-ecosystems / D.K. Choudhary, A.K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, N. Tuteja (Eds.). – Singapore: Springer Singapore, 2017. – P. 15-24.
192. Schulz-Bohm, K. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra-and inter-kingdom interactions / K. Schulz-Bohm, Martín-Sánchez L, Garbeva P // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – 2484.
193. Santoro, M.V. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*) / M.V. Santoro, J. Zygadlo, W. Giordano, E. Banchio // Plant Physiol. Biochem. – 2011. – Vol. 49, №10. – P. 1177-1182.
194. Piechulla, B. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi / B. Piechulla, M.C. Lemfack, M. Kai // Plant Cell Environ. – 2017. – Vol. 40, №10. – P. 2042-2067.
195. Raza, W. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum* / W. Raza, N. Ling, D. Liu et al. // Microbiol. Res. – 2016. – Vol. 192. – P. 103-113.
196. Cho, S.M. 2R,3R-Butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana* / S.M. Cho, B.R. Kang, S.H. Han et al. // Mol. Plant Microbe Interact. – 2008. – Vol. 21, №8. – P. 1067-1075.

197. Jain, A. Microbial consortium-mediated reprogramming of defence network in pea to enhance tolerance against *Sclerotinia sclerotiorum* / A. Jain, S. Singh, B. Kumar Sarma, H. Bahadur Singh // J. Appl. Microbiol. – 2012. – Vol. 112, №3. – P. 537-550.
198. Jain, A. Microbial consortium-induced changes in oxidative stress markers in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum* / A. Jain, A. Singh, S. Singh, H.B. Singh // J. Plant Growth Regul. – 2013. – Vol. 32, №2. – P. 388-398.
199. Jain, A. Biological management of *Sclerotinia sclerotiorum* in pea using plant growth promoting microbial consortium / A. Jain, A. Singh, S. Singh, H.B. Singh // J. Basic Microbiol. – 2015. – Vol. 55, №8. – P. 961-972.
200. Singh, A. Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection / A. Singh, A. Jain, B.K. Sarma et al. // Microbiol. Res. – 2014. – Vol. 169, №5-6. – P. 353-360.
201. Jain, A. Biocontrol agents-mediated suppression of oxalic acid induced cell death during *Sclerotinia sclerotiorum*-pea interaction / A. Jain, A. Singh, S. Singh et al. // J. Basic Microbiol. – 2015. – Vol. 55, № 5. – P. 601-606.
202. Bakker, P.A.H.M. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. / P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse, L.C. van Loon // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97, № 2. – P. 239-243.
203. Meziane, H. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants / H. Meziane, I. Van der Sluis, L.C. Van Loon et al. // Mol. Plant Pathol. – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. 177-185.
204. Leeman, M. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens* / M. Leeman, F.M. Den Ouden, J.A. Van Pelt et al. // Phytopathology. – 1996. – Vol. 86, №2. – P. 149-155.
205. Iavicoli, A. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0 / A. Iavicoli, E. Boutet, A. Buchala, J.-P. Mretraux // Mol. Plant Microbe Interact. – 2003. – Vol. 16, №10. – P. 851-858.
206. Pieterse, C.M.J. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria / C.M.J. Pieterse, J.A. Van Pelt, B.W.M. Verhagen et al. // Symbiosis. – 2003. – Vol. 35, № 1-3. – P. 39-54.
207. Saravanakumar, D. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants / D. Saravanakumar, M. Kavino, T. Raguchander et al. // Acta Physiol. Plant. – 2011. – Vol. 33, №1. – P. 203-209.
208. Novik, G. An Insight Into Beneficial *Pseudomonas* bacteria / G. Novik, V. Savich, E. Kiseleva // Microbiology in Agriculture and Human Health / M.M. Shah (Ed.). – Croatia: Intech, 2015.

209. Dayanandan, A. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach / A. Dayanandan, J. Kanagaraj, L. Sounderraj et al. // J. Clean. Prod. – 2003. – Vol. 11, №5. – P. 533-536.
210. Boopathy, N.R. Statistical medium optimization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10501, its characterization and application in leather processing / N.R. Boopathy, D. Indhuja, K. Srinivasan et al. // Indian J. Exp. Biol. – 2013. – Vol. 51, №4. – P.336-342.
211. Kojima, Y. Different specificities of two types of *Pseudomonas* lipases for C20 fatty acids with a $\Delta 5$ unsaturated double bond and their application for selective concentration of fatty acids / Y. Kojima, E. Sakuradani, S. Shimizu // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – Vol. 101, №6. – P. 490-500.
212. Cheirsilp, B. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction / B. Cheirsilp, P. Jeamjounkhaw, A.H. Kittikun // J. Mol. Catal. B Enzym. – 2009. – Vol. 59, №1-3. – P. 206-211.
213. Zhang, A. Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963 / A. Zhang, R. Gao, N. Diao et al. // J. Mol. Catal. B Enzym. – 2009. – Vol. 56, №2-3. – P. 78-84.
214. Priya, K. Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase / K. Priya, A. Chadha // Enzyme Microb. Technol. – 2003. – Vol. 32, №3-4. – P. 885-890.
215. Li, Q. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase / Q. Li, Y. Yan // Appl. Energy. – 2008. – Vol. 87, №10. – P. 3148-3154.
216. Kumar, V. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by using *Pseudomonas* species isolated from petroleum contaminated soil / V. Kumar, S. Singh, A. Manhas et al. // Oriental J. Chem. – 2014. – Vol. 30, №4. – P. 1771-1776.
217. Sathiya-Moorthi, P. Bioremediation of automobile oil effluent by *Pseudomonas* sp. / P. Sathiya-Moorthi, M. Deecaraman, P.T. Kalaichelvan // Adv. Biotech. – 2008. – Vol. 31. – P. 34-37.
218. Roy, A.S. Bioremediation of crude oil contaminated tea plantation soil using two *Pseudomonas aeruginosa* strains AS 03 and NA 108 / A.S. Roy, R. Yenn, A.K. Singh et al. // African J. Biotechnol. – 2013. – Vol. 12, №19. – P. 2600-2610.
219. Baltazar, M. Bioremediation potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* isolated from a copper-contaminated area / M. Baltazar, L. Gracioso, I. Avanzi et al. // BMC Proc. – 2014. – Vol. 8 (Suppl 4). – P. 188.
220. Ali Khan, M.W. Detoxification and bioremediation potential of a *Pseudomonas fluorescens* isolate against the major Indian water pollutants / M.W. Ali Khan, M. Ahmad // J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. – 2006. – Vol. 41, №4. – P. 659-674.

221. Singh, R. Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* an innovative bioremediation tool in multi metals ions from simulated system using multi response methodology / R. Singh, N.R. Bishnoi, A. Kirrolia // *Bioresour. Technol.* – 2013. – Vol. 138. – P. 222-234.

222. Sagar, A. ACC deaminase and antioxidant enzymes producing halophilic *Enterobacter* sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress / A. Sagar, R.Z. Sayyed, P.W. Ramteke et al. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2020. – Vol. 26, №9. – P. 1847-1854.

223. Kalam, S. Plant root-associated biofilms in bioremediation / S. Kalam, A. Basu, S. Ankati // *Biofilms in Plant and Soil Health* / I. Ahmad, F.M. Husain (Eds.). – Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2017. – P. 337-355.

224. Etesami, H. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects / H. Etesami, D.K. Maheshwari // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2018. – Vol. 156. – P. 225-246.

225. Mahdi, I. Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 isolated from *Chenopodium quinoa* Willd / I. Mahdi, N. Fahsi, M. Hafidi et al. // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8, №6. – 948.

226. Raimi, A. Soil fertility challenges and biofertiliser as a viable alternative for increasing smallholder farmer crop productivity in sub-Saharan Africa / A. Raimi, R. Adeleke, A. Roopnarain // *Cogent Food Agric.* – 2017. – Vol. 3. – 1400933.

227. Hassen, A.I. Microbial inoculants as agents of growth promotion and abiotic stress tolerance in plants / A.I. Hassen, F. Bopape, L. Sanger // *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity, vol 1* / D. Singh, H. Singh, R. Prabha (Eds.). – New Delhi: Springer, 2016. – P. 23-36.

228. Singh, D.P. Book review: Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity – Vol 2: Functional application / D.P. Singh, H.B. Singh, R. Prabha // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – 2105.

229. Shaharoon, B. Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.) / B. Shaharoon, M. Naveed, M. Arshad, Z.A. Zahir // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 79, №1. – P. 147-155.

230. Mavrodi, O.V. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas* / O.V. Mavrodi, N. Walte, S. Elateek et al. // *Biol. Control.* – 2012. – Vol. 62, №2. – P. 93-102.

231. Krey, T. Effects of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions / T. Krey, N. Vassilev, C. Baum, B. Eichler-Löbermann // *Europ. J. Soil Biol.* – 2013. – Vol. 55. – P. 124-130.

232. Narendra Babu, A. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase / A. Narendra Babu, S. Jogaiah, S. Ito et al. // *Plant Sci.* – 2014. – Vol. 231. – P. 62-73.
233. Timmusk, S. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement / S. Timmusk, L. Behers, J. Muthoni et al. // *Front. Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8. – 49.
234. Kumar, V. Microbial Plant Probiotics: Problems in Application and Formulation / N. Bharti, S.K. Sharma, S. Saini et al. // *Probiotics and Plant Health* / V. Kumar, M. Kumar, S. Sharma, R. Prasad (Eds.). – Singapore: Springer, 2017. – P. 317-335.
235. Aloo, B.N. Plant Growth Promoting Rhizobacterial Biofertilizers for Sustainable Crop Production: The Past, Present, and Future / B.N. Aloo, B.A. Makumba, E.R. Mbega // *Preprints.* – 2020. – 2020090650.
236. Timmusk, S. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement / S. Timmusk, L. Behers, J. Muthoni et al. // *Front. Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8. – 49.
237. Soumare, A. Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture / A. Soumare, A.G. Diedhiou, M. Thuita, M. et al. // *Plants (Basel).* – 2020. – Vol. 9, №8. – 1011.
238. Basu, A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects / A. Basu, P. Prasad, S.N. Das et al. // *Sustainability.* – 2021. – Vol. 13, №3. – 1140.
239. Rodríguez-Navarro, D.N. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects / D.N. Rodríguez-Navarro, I. Margaret Oliver, M. Albareda Contreras, J.E. Ruiz-Sainz // *Agronomy Sust. Developm.* – 2011. – Vol. 31. – P. 173-190.
240. Lesueur, D. The Production and Potential of Biofertilizers to improve Crop Yields / D. Lesueur, R. Deaker, L. Herrmann et al. // *Bioformulations for Sustainable Agriculture* / N.K. Arora, S. Menhaz, R. Balestrini (Eds.). – New Delhi: Springer, 2016. – P. 71-92.
241. Verma, M. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Diversity and Applications / M. Verma, J. Mishra, N.K. Arora // *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future* / R. Sobti, N.K. Arora, R. Kothari. (Eds.). – Singapore: Springer, 2019. – P. 129-173.
242. Celador-Lera, L. Biofertilizers Based on Bacterial Endophytes Isolated from Cereals: Potential Solution to Enhance These Crops / L. Celador-Lera, A. Jiménez-Gómez, E. Menéndez, R. Rivas. // *Stress Management and Agricultural Sustainability* / V.S. Meena (Ed.). – Singapore: Springer, 2018. – Vol. 1. – P. 175-203.

243. Uribe, D. Role of microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the Tropics / D. Uribe, J. Sánchez-Nieves, J. Vanegas // Soil Biology and Agriculture in the Tropics / P. Dion (Ed.). – Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, 2010. – P. 235-250.

244. Mustafa, S. Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: From theoretical to pragmatic approach / S. Mustafa, S. Kabir, U. Shabbir, R. Batool // Symbiosis. – 2019. – Vol. 78. – P. 115-123.

245. Mehnaz, S. An overview of globally available bioformulations / S. Mehnaz // Bioformulations: For Sustainable Agriculture / N. Arora, S. Mehnaz, R. Balestrini (Eds.). – New Delhi, India: Springer, 2016. – P. 268-281.

246. Maçik, M. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms / M. Maçik, A. Gryta, M. Frac // Advances in Agronomy / D.L. Sparks (Ed.). – Cambridge, MA, USA: Academic Press Inc., 2020. – Vol. 162. – P. 31-87.

247. Odoh, C.K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A novel Agent for sustainable Food production / C.K. Odoh, C.N. Eze, U.K. Akpi, V.U. Unah // Am. J. Agric. Biol. Sci. – 2019. – Vol. 14, №1. – P. 35-54.

248. Adeleke, R.A. Status and Prospects of Bacterial Inoculants for Sustainable Management of Agroecosystems / R.A. Adeleke, A.R. Raimi, A. Roopnarain, S.M. Mokubedi // Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment / B. Giri, R. Prasad, Q.S. Wu, A. Varma (Eds.). – Cham: Springer International Publishing, 2019. – P. 137-172.

249. Weekley, J. Micro-level management of agricultural inputs: emerging approaches / J. Weekley, J. Gabbard, J. Nowak // Agronomy. – 2012. – Vol. 2. – P. 321-357.

250. Yanni, Y. Enhanced symbiotic performance and productivity of drought stressed common bean after inoculation with tolerant native rhizobia in extensive fields / Y. Yanni, M. Zidan, F. Dazzo et al. // Agricul. Ecosyst. Environ. – 2016. – Vol. 232. – P. 119-128.

251. Koskey, G. Potential of Native Rhizobia in Enhancing Nitrogen Fixation and Yields of Climbing Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Contrasting Environments of Eastern Kenya / G. Koskey, S.W. Mburu, E.M. Njeru et al. // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – 443.

252. Manasa, K. Characterization of *Rhizobium* isolates and their potential PGPR characteristics of different rhizosphere soils of Telangana region, India / K. Manasa, R.S. Reddy, S. Triveni et al. // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. – 2017. – Vol. 6, №5. – P. 2808-2813.

253. Muleta, D. The potential for rhizobial inoculation to increase soybean grain yields on acid soils in Ethiopia / D. Muleta, M.H. Ryder, M.D. Denton // Soil Sci. Plant Nutr. – 2017. – Vol. 63, №5. – P. 1-11.

254. Mahanty, T. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development / T. Mahanty, S. Bhattacharjee, M. Goswami et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. – 2017. – Vol. 24, №4. – P. 3315-3335.
255. Salkowski, E. Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus / E. Salkowski // Zeitschrift für Physiologische Chemie. – 1885. – Vol. 9. – P. 23-33.
256. Gordon, S.A. Colorimetric estimation of indoleacetic acid / S.A. Gordon, R.P. Weber // Plant Physiol. – 1951. – Vol. 26, №1. – P. 192-195.
257. Arora, N.K. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria / N.K. Arora, M. Verma // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7, №6. – 381.
258. Sayyed, R. Production of microbial iron chelators (siderophores) by fluorescent Pseudomonads / R. Sayyed, M. Badgujar, H. Sonawane et al. // Indian J. Biotechnol. – 2005. – Vol. 4, №4. – P. 484-490.
259. Garbeva, P. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas* / P. Garbeva, C. Hordijk, S. Gerards, W. de Boer // FEMS Microbiol. Ecol. – 2014. – Vol. 87, №3. – P. 639-649.
260. Методические указания по фитосанитарному и фитотоксикологическому мониторингам плодовых пород и ягодников. – Краснодар: СКЗНИИСиВ, 1999. – 83 с.
261. Методические указания по регистрационным испытаниям фунгицидов в сельском хозяйстве / под ред. В. И. Долженко. – СПб., 2009 г. – 378 с.
262. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М.: Урожай, 1985. – 336 с.
263. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1973. – 240 с.
264. Евсеев, В.В. Фитосанитарный мониторинг: Учебное пособие / В.В. Евсеев. – Saarbrücken, Deutschland: PalmariumAcademicPublishing, 2015. – 88 с.
265. Голощاپов, А.П. Методы селекции пшеницы на иммунитет: Учебное пособие / А.П. Голощاپов. – Курган: ГИПП «Зауралье», 2002. – 112 с.
266. Ефимов, В.Н. Пособие к учебной практике по агрохимии / В.Н. Ефимов, В.Г. Калиниченко, М.Л. Горлова – Л.: Агропромиздат, 1988. – 208 с.
267. Масленникова, С.Н. Эндифитные бактерии семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и ели гибридной (*Picea abies* (L.) Karst × *Picea obovata* Ledeb) / С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь и др. // Вестник Казанского технологического университета. – Т. 15, №16. – 2012. – С. 175-178.
268. Масленникова, С.Н. Выделение эпифитных бактерий персика (*Persica* Mill.) в условиях субтропической зоны России и оценка их хозяйственно-ценных свойств / С.Н.

Масленникова, А.В. Щербаков, Е.В. Рогожина // Субтропическое и декоративное садоводство. – №63. – 2017. – с. 195-200.

269. Масленникова, С.Н. Оценка хозяйственно-ценных свойств ризосферных бактерий чайного растения (*Camelia sinensis* (L.) Kuntze) в условиях субтропической зоны России / С.Н. Масленникова, А.В. Щербаков, Е.В. Рогожина // Субтропическое и декоративное садоводство. – №61. – 2017. – с. 210-215.

270. Масленникова, С.Н. Ризосферные бактерии сеянцев *Pinus sylvestris* L. и оценка их хозяйственно ценных качеств / С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь и др. // Вестник Казанского технологического университета. – Т. 15, №18. – 2012. – С. 207-211.

271. Kousser, C. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits *Rhizopus microsporus* germination through sequestration of free environmental iron / C. Kousser, C. Clark, S. Sherrington et al. // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9, №1. – 5714.

272. Spiers, A.J. A mechanistic explanation linking adaptive mutation, niche change, and fitness advantage for the wrinkly spreader / A.J. Spiers // Int. J. Evol. Biol. – 2014. – Vol. 2014. – 675432.

273. Масленникова, С.Н. Перспективный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве продуцента для создания биофунгицида / С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов // Агрехимический вестник. – №1. – 2021. – С. 43-47.

274. Масленникова, С.Н. Ростстимулирующая и биоконтрольная активности штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW / С.Н. Масленникова // Современные проблемы медицины и естественных наук: сборник статей Международной научной конференции. Вып. 8, Йошкар-Ола, 15-19 апреля 2019 г. Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2019. – С. 143-145.

275. Масленникова, С.Н. Антагонистический потенциал ризосферной бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW против патогенных грибов сельскохозяйственных культур / С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов // Материалы VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. – 2019. – №3 (30). – С. 39.

276. Масленникова, С.Н. Антифунгальная активность ризосферной бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW против фитопатогенных грибов / С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов // IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. – СПб.: ФГБНУ ВИЗР. – 2019. – С. 118.

277. Guevara-Avenidaño, E. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer,

and *Colletotrichum gloeosporioides* / E. Guevara-Avedaño, A.A. Bejarano-Bolívar, A.L. Kiel-Martínez et al. // Microbiol. Res. – 2019. – Vol. 219. – P. 74-83.

278. Kong, W.L. Forest tree associated bacterial diffusible and volatile organic compounds against various phytopathogenic fungi / W.L. Kong, P.S. Li, X.Q. Wu et al. // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8, №4. – 590.

279. Tagele, S.B. Phenazine and 1-undecene producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain KNU17Pc1 for growth promotion and disease suppression in korean maize cultivars / S.B. Tagele, H.G. Lee, S.W. Kim, Y.S. Lee // J. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 29, №1. – P. 66-78.

280. O'Gara, F. Biocontrol of Root Diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Current Concepts and Experimental Approaches / C. Voisard, C.T. Bull, C. Keel et al. // Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs / F. O'Gara, D.N. Dowling, B. Boesten (Eds.). – US: Wiley-Blackwell, 1994. – P. 67-89.

281. Hao, H.T. Comparative digital gene expression analysis of the Arabidopsis response to volatiles emitted by *Bacillus amyloliquefaciens* / H.T. Hao, X. Zhao, Q.H. Shang et al. // PloS One. – 2016. – Vol. 11, №8. – e0158621.

282. Meldau, D.G. Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium bacillus sp B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition / D.G. Meldau, S. Meldau, L.H. Hoang et al. // Plant Cell. – 2013. – Vol. 25, №7. – P. 2731-2747.

283. Fincheira, P. Microbial volatiles as plant growth inducers / P. Fincheira, A. Quiroz // Microbiol. Res. – 2018. – Vol. 208. – P. 63-75.

284. Rodríguez, H. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains / H. Rodríguez, T. Gonzalez, G. Selman // J. Biotechnol. – 2001. – Vol. 84, №2. – P. 155-161.

285. Becker, D. Expression of the NH⁽⁺⁾(4)-transporter gene LEAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria / D. Becker, R. Stanke, I. Fendrik et al. // Planta. – 2002. – Vol. 215, №3. – P. 424-429.

286. Бактериальный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW для защиты растений от болезней: пат. 2711873 Рос. Федерация № 2019120508; заявл. 02.07.2019; опубл. 23.01.2020, Бюл. №3. 9 с.

287. Berninger, T. Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants / T. Berninger, Ó. González López, A. Bejarano et al. // Microb. Biotechnol. – 2018. – Vol. 11, №2. – P. 277-301.

288. Brahmprakash, G. Role of additives in improving efficiency of bioformulation for plant growth and development / G. Brahmprakash, P. Sahu, G. Lavanya, G., et al. // *Front. Soil Environ. Microbiol.* / S.K. Nayak, B.B. Mishra (Eds.). – USA: CRC Press, 2020. – P. 1-10.
289. Vassilev, N. Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives / N. Vassilev, M. Vassileva, V. Martos et al. // *Front. Plant Sci.* – 2020. – Vol. 11. – 270.
290. García, A. H. Anhydrobiosis in bacteria: from physiology to applications / A.H. García // *J. Biosci.* – 2011. – Vol. 36, №5. – P. 939-950.
291. Potts, M. Desiccation tolerance of prokaryotes / M. Potts // *Microbiol. Rev.* – 1994. – Vol. 58, №4. – P. 755-805.
292. Schisler, D.A. Appraisal of selected osmoprotectants and carriers for formulating Gram-negative biocontrol agents active against *Fusarium* dry rot on potatoes in storage / D.A. Schisler, P.J. Slininger, N.L. Olsen // *Biol. Control.* – 2016. – Vol. 98. – P. 1-10.
293. Cabrefiga, J. Improvement of fitness and efficacy of a fire blight biocontrol agent via nutritional enhancement combined with osmoadaptation / J. Cabrefiga, J. Francés, E. Montesinos, A. Bonaterra // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77, №10. – P. 3174-3181.
294. Costa, E. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying / E. Costa, J. Usall, N. Teixidó et al. // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – Vol. 89, №5. – P. 793-800.
295. Санин, С. С. Проблемы фитосанитарии России на современном этапе / С. С. Санин // *Защита и карантин растений.* – 2016. – № 4. – С. 3-6.
296. Павлюшин, В.А. Формирование агроэкосистем и становление сообществ вредных видов биотрофов / В.А. Павлюшин, Н.А. Вилкова, Г.И. Сухорученко, Л.И. Нефедова // *Вестник защиты растений.* – 2016. – № 2. – С. 5-15.
297. Лаптиеv, А. Б. Совершенствование средств и приёмов химической защиты растений / А. Б. Лаптиеv // Третий Всероссийский съезд по защите растений (16-20 декабря 2013 г., СПб.). Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем: материалы съезда в трёх томах. – СПб., 2013. – Т. 2. – С. 206-210.
298. Гришечкина, Л. Д. Пути формирования эффективного и безопасного ассортимента фунгицидов на зерновых культурах / Л. Д. Гришечкина, В. И. Долженко // Третий Всероссийский съезд по защите растений (16-20 декабря 2013 г., СПб.). Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем: материалы съезда в трёх томах. – СПб., 2013. – Т. 2. – С. 167-169.
299. Якушина, Н.А. Снижение экологического риска применения пестицидов при защите виноградных насаждений Украины от вредных организмов / Н.А. Якушина, Н.В. Алейникова, Я.Э. Радионовская и др. – Ялта: «VIZAVI», 2013. – 28 с.

300. Масленникова, С.Н. Бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве антагониста заболеваний яблони / С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. – 2020. - №3 (34). – С. 198.

301. Масленникова, С.Н. *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве биоконтрольного агента для защиты винограда / С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию отдела энтомологии, фитопатологии и защиты растений Никитского ботанического сада «Актуальные проблемы и перспективы интегрированной защиты плодовых, декоративных и лесных культур» / ФГБУН «НБС-ННЦ», г. Ялта, Республика Крым, Россия. 12–16 октября 2020 г. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2020. – С. 112-115.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Масленникова, С.Н.** Эндوفитные бактерии семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и ели гибридной ((*Picea abies* (L.) Karst × *Picea obovata* Ledeb) / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2012. – Т. 15, №16. – С. 175-178. [ВАК, ИФ=0,586, цит. 5]**
2. **Масленникова, С.Н.** Ризосферные бактерии сеянцев *Pinus sylvestris* L. и оценка их хозяйственно ценных качеств / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2012. – Т. 15, №18.– С. 207-211. [ВАК, ИФ=0,586, цит. 3]**
3. **Масленникова, С.Н.** Эндوفитные бактерии хвойных растений: последние исследования и перспективы применения / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2013. – Т. 16, №23.– С. 139-143. [ВАК, ИФ=0,586, цит. 8]**
4. **Масленникова, С.Н.** Биоразнообразие ризосферных микроорганизмов древесных пород / **С.Н. Масленникова, А.И. Шургин, В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, А.В. Канарский // Вестн. Казанск. Технол. Универ. – 2014. – Т. 17, №4.– С. 193-197. [ВАК, ИФ=0,586, цит. 4]**
5. Чеботарь, В.К. Эндوفитные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, Е.Н. Щербакова, **С.Н. Масленникова, А.Н. Заплаткин, Н.В. Мальфанова // Сельскохоз. Биол. – 2015. – Т. 50, №5. – С. 648-654. [Scopus, SJR=0,170, цит. 33]**
6. Chebotar, V.K. Endophytic bacteria of woody plants as the basis of complex microbial preparations for agriculture and forestry / V.K. Chebotar, A.V. Shcherbakov, **S.N. Maslennikova, A. N. Zaplatkin, A.V. Kanarskiy, A.A. Zavalin // Russ. Agricult. Sci. – 2016. – Vol. 42, №5. – P. 339-342. [Web of Science, IF=0,717 , цит. 4]**

Патенты

1. Пат. 2711873 РФ № 2019120508. Бактериальный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW для защиты растений от болезней / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов. – Заявл. 02.07.2019; опубл. 23.01.2020, Бюл. №3. – 9 с.**

2. Пат. 2752903 РФ № 2021103338. Смесь бактериальных штаммов, обладающая целлюлозолитической и фунгицидной активностью / **С.Н. Масленникова**, С.Д. Каракотов. – Заявл. 11.02.2021; опубл. 11.08.2021, Бюл. № 23. – 11 с.

3. Пат. 2778562 РФ № 2022104539. Смесь бактериальных штаммов, обладающая азотфиксирующей, фосфор- и калиймобилизующей активностью / **С.Н. Масленникова**, А.С. Петровский. – Заявл. 22.02.2022; опубл. 22.08.2022, Бюл. №24. – 10 с.

Статьи в других изданиях

1. Чеботарь, В.К. Эндوفитные бактерии – основа комплексных микробных препаратов для сельского и лесного хозяйства / В.К. Чеботарь, А.В. Щербаков, **С.Н. Масленникова**, А.Н. Заплаткин, А.В. Канарский, А.А. Завалин // **Агрохимия. – 2016. – №11. – С. 65-70. [ИФ=0,884, цит. 2]**

2. **Масленникова, С.Н.** Оценка хозяйственно-ценных свойств ризосферных бактерий чайного растения (*Camelia sinensis* (L.) Kuntze) в условиях субтропической зоны России / **С.Н. Масленникова**, А.В. Щербаков, Е.В. Рогожина // **Субтропическое и декоративное садоводство. – 2017. – №61. – С. 210-215. [ИФ=0,319, цит. 1]**

3. **Масленникова, С.Н.** Выделение эпифитных бактерий персика (*Persica* Mill.) в условиях субтропической зоны России и оценка их хозяйственно-ценных свойств / **С.Н. Масленникова**, А.В. Щербаков, Е.В. Рогожина // **Субтропическое и декоративное садоводство. – 2017. – №63. – С. 195-200. [ИФ=0,319, цит. 0]**

4. Орынбаев, А.Т. Биологическая эффективность различных препаратов против семенной инфекции сосудистого бактериоза капусты / А.Т. Орынбаев, Ф.С-У. Джалилов, **С.Н. Масленникова** // **Овощи России. – 2019. – №2 (46). – С. 88-91. [ИФ=0,744, цит. 1]**

5. **Масленникова, С.Н.** Перспективный штамм *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве продуцента для создания биофунгицида / **С.Н. Масленникова**, С.Д. Каракотов // **Агрохимический вестник. – 2021. – №1. – С. 43-47. [ИФ=0,622, цит. 0]**

6. Каракотов, С.Д. Применение микробиологических препаратов-деструкторов в технологии защиты сахарной свеклы от болезней / С.Д. Каракотов, **С.Н. Масленникова**, Г.А. Селиванова, М.Ю. Гаврилова // **Сахарная свёкла. – 2021. – №3. – С. 18-21. [ИФ=0,201, цит. 0]**

Тезисы

1. **Масленникова, С.Н.** Ростстимулирующая и биоконтрольная активности штамма *Pseudomonas asplenii* 11RW / **С.Н. Масленникова** // **Современные проблемы медицины и**

естественных наук: сборник статей Международной научной конференции. Вып. 8, Йошкар-Ола, 15-19 апреля 2019 г. Мар. гос. ун-т. – Йошкар-Ола, 2019. – С. 143-145.

2. **Масленникова, С.Н.** Антагонистический потенциал ризосферной бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW против патогенных грибов сельскохозяйственных культур / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // Материалы VII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. – 2019. – №3 (30). – С. 39.

3. **Масленникова, С.Н.** Биоконтроль фузариозной корневой гнили ризосферными штаммами рода *Pseudomonas* / **С.Н. Масленникова** // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XI Междунар. науч. конф. (Минск, 3-6 июня 2019 г.) / орг. ком. конф.: Э. И. Коломиец (председатель) и [др.]. – Минск: Беларуская навука, 2019. – С. 172-173.

4. **Масленникова, С.Н.** Бактерии р. *Pseudomonas* в качестве продуцентов для создания биопрепаратов / **С.Н. Масленникова** // Биосистемы: организация, поведение, управление: Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых (Н.Новгород, 23–26 апреля 2019 г.). Н.Новгород, Университет Лобачевского. – 2019. – С. 149.

5. **Масленникова, С.Н.** Антифунгальная активность ризосферной бактерии *Pseudomonas asplenii* 11RW против фитопатогенных грибов / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. – СПб.: ФГБНУ ВИЗР. – 2019. – С. 118.

6. **Масленникова, С.Н.** *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве биоконтрольного агента для защиты винограда / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию отдела энтомологии, фитопатологии и защиты растений Никитского ботанического сада «Актуальные проблемы и перспективы интегрированной защиты плодовых, декоративных и лесных культур» / ФГБУН «НБС-ННЦ», г. Ялта, Республика Крым, Россия. 12–16 октября 2020 г. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2020. – С. 112-115.

7. **Масленникова, С.Н.** *Pseudomonas asplenii* 11RW в качестве антагониста заболеваний яблони / **С.Н. Масленникова, С.Д. Каракотов** // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». – Актуальная биотехнология. – 2020. – №3 (34). – С. 198.

Патогены, использованные для исследования антагонистической активности штамма

Pseudomonas asplenii 11RW

| № | Фитопатоген | Культура | Источник выделения |
|-----------------------------|--|-----------------|---|
| ФИТОПАТОГЕННЫЕ ГРИБЫ | | | |
| 1 | <i>Alternaria tenuissima</i> 481-101 | Пшеница | Зерно, Приморский край |
| 2 | <i>Bipolaris sorokiniana</i> | | Зерно, Курганская область |
| 3 | <i>Fusarium avenaceum</i> 45 | | Колос, Ленинградская область |
| 4 | <i>Fusarium graminearum</i> 58918 | | Колос пшеницы сорта Гром, Краснодарский край, Тихорецкий район |
| 5 | <i>Fusarium graminearum</i> 159811 | | Зерно, Ставропольский край |
| 6 | <i>Fusarium oxysporum</i> 96801 | | Зерно, Северная Осетия |
| 7 | <i>Fusarium solani</i> 104803 | | Зерно, Башкирия |
| 8 | <i>Fusarium sporotrichioides</i> 58871 | | Колос пшеницы сорта Таня, Краснодарский край, Каневский район |
| 9 | <i>Fusarium sporotrichioides</i> 58878 | | Колос пшеницы сорта Фортуна, Краснодарский край, Выселковский район |
| 10 | <i>Fusarium tricinctum</i> 58869 | | Колос пшеницы сорта Таня, Краснодарский край, Каневский район |
| 11 | <i>Fusarium proliferatum</i> MFG 58919 | | Колос пшеницы сорта Фортуна, Краснодарский край, Выселковский район |
| 12 | <i>Fusarium ussurianum</i> 29813 | | Дальний Восток |
| 13 | <i>Septoria</i> sp. | | Зерно, Курганская область |
| 14 | <i>Fusarium culmorum</i> 30 | Ячмень | Колос, Ленинградская область |
| 15 | <i>Fusarium sibiricum</i> 11007 | | Красноярский край, Амурская область |
| 16 | <i>Fusarium sporotrichioides</i> 88503 | | Зерно, Белгородская область |
| 17 | <i>Pyrenophora teres</i> | | Лист, Крым |
| 18 | <i>Drechslera avenae</i> | Овёс | Зерно, Курганская область |
| 19 | <i>Fusarium poae</i> MFG 103403 | | Зерно, Калининградская область |
| 20 | <i>Penicillium</i> sp. 126900 | | Зерно, Дальний Восток |
| 21 | <i>Fusarium culmorum</i> 63 | Рожь | Колос, Нижегородская область |
| 22 | <i>Alternaria alternata</i> (ВНИИС) | Сахарная свёкла | Воронежская область |
| 23 | <i>Cercospora beticola</i> В-3191 | | Лист, Греция |
| 24 | <i>Cercospora beticola</i> В-3192 | | Лист, США, штат Техас |
| 25 | <i>Cladosporium herbarum</i> | | Воронежская область |

| | | | |
|----|---|---|---|
| 26 | <i>Epicoccum purpurascens</i> | | Воронежская область |
| 27 | <i>Fusarium proliferatum</i> (ВНИИС) | | Воронежская область |
| 28 | <i>Helminthosporium sativum</i> | | Воронежская область |
| 29 | <i>Phoma betae</i> | | Воронежская область |
| 30 | <i>Macrophomina phaseolina</i> | | Белгородская область |
| 31 | <i>Alternaria solani</i> 473 | Картофель | Клубни, Ленинградская область |
| 32 | <i>Phytophthora infestans</i> 40 | | Листья, Рязанская область |
| 33 | <i>Alternaria alternata</i> Д6 | | Листья, Москва |
| 34 | <i>Colletotrichum lini</i> 707 | Лён | Тверская область |
| 35 | <i>Colletotrichum lini</i> 713 | | Тверская область |
| 36 | <i>Fusarium oxysporum</i> 352 | | Тверская область |
| 37 | <i>Ozonium vinogradovi</i> 2 | | Тверская область |
| 38 | <i>Pyricularia oryzae</i> 16 | Рис | Ножка метелки, сорт Рапан, Славянский район |
| 39 | <i>Pyricularia oryzae</i> 18 | | Лист, сорт Рапан, Славянский район |
| 40 | <i>Verticillium dahliae</i> 34/1 | Хлопчатник | Средняя Азия |
| 41 | <i>Verticillium dahliae</i> ТА-4 | | Таджикистан |
| 42 | <i>Aspergillus niger</i> | Подсолнечник | Стебель, Краснодарский край |
| 43 | <i>Phomopsis helianthi</i> F-3408 | | Стебель, Молдавия |
| 44 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> F-879 | | Стебель |
| 45 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | Соя | Соя, Московская область |
| 46 | <i>Ascochyta rabiei</i> | Нут | Лист, Орловская область |
| 47 | <i>Alternaria alternata</i> 245 | Фитопатогены, выделенные из почвы | Ленинградская область |
| 48 | <i>Bipolaris sorokiniana</i> 130 | | Ленинградская область |
| 49 | <i>Microdochium nivale</i> | | Ленинградская область |
| 50 | <i>Monilia fructigena</i> 483 | | Садовая почва, Ленинградская область |
| 51 | <i>Rhizoctonia solani</i> 170 | | Ленинградская область |
| 52 | <i>Typhula ishkariensis</i> | | Московская область |
| 53 | <i>Rhizoctonia solani</i> F-895 | Капуста | Украина, Харьков |
| 54 | <i>Alternaria</i> sp. B2 | Виноград | Ягода, Крым |
| 55 | <i>Alternaria</i> sp. B3 | | Лист, Крым |
| 56 | <i>Alternaria</i> sp. B5 | | Лист, Крым |
| 57 | <i>Alternaria</i> sp. B6 | | Ягода, Крым |
| 58 | <i>Alternaria</i> sp. B7 | | Лист, Крым |
| 59 | <i>Alternaria</i> sp. B10 | | Ягода, Крым |
| 60 | <i>Alternaria</i> sp. B12 | | Лист, Крым |
| 61 | <i>Alternaria alternata</i> 1 | | Лист винограда сорта «Мускат белый», Крым, Ялтинский район |
| 62 | <i>Alternaria</i> sp. 15-22 | | Лист винограда сорта «Шардоне», Крым, Бахчисарайский район |
| 63 | <i>Alternaria</i> sp. 15-23 | | Лист винограда сорта «Шардоне», Крым, Бахчисарайский район, с. Плодовое |
| 64 | <i>Alternaria</i> sp. 16 | | Лист винограда сорта «Ркацители», Крым, Бахчисарайский район |
| 65 | <i>Aspergillus niger</i> 17 | | Ягода, Крым, ЮБК |
| 66 | <i>Botrytis cinerea</i> 4 | | Ягода винограда сорта «Бастардо», Крым |

| | | | | |
|-----|--------------------------------------|--------------|--|--|
| 67 | <i>Cladosporium</i> sp. 5 | | Ягода винограда сорта «Мускат белый», Крым, Ливадия | |
| 68 | <i>Cladosporium herbarum</i> | | Крым | |
| 69 | <i>Dactylonectria macrodidyma</i> 13 | | Корни лозы винограда сорта «Ркацители», Крым, район Золотая балка | |
| 70 | <i>Fusarium</i> sp. | | Крым | |
| 71 | <i>Fusarium</i> sp. 14 | | Ягода винограда сорта «Мускат белый», Крым, Ливадия | |
| 72 | <i>Guignardia bidwellii</i> 9 | | Ягода винограда сорта «Италия», Крым | |
| 73 | <i>Macrophoma flaccida</i> | | Крым | |
| 74 | <i>Penicillium</i> sp. 8 | | Ягода винограда сорта «Мускат белый», Крым, ЮБК | |
| 75 | <i>Rhizopus</i> sp. 3 | | Ягода винограда сорта «Кардинал», Крым, Бахчисарайский район, с. Угловое | |
| 76 | <i>Alternaria</i> sp. 3 | Яблоня | Лист яблони Заря Алатау, Москва | |
| 77 | <i>Alternaria</i> sp. 5 | | Лист яблони Заря Алатау, Москва | |
| 78 | <i>Alternaria</i> sp. 17-1 | | Лист яблони Заря Алатау, Москва | |
| 79 | <i>Alternaria</i> sp. 17-2 | | Лист яблони Заря Алатау, Москва | |
| 80 | <i>Alternaria</i> sp. 15 | | Лист яблони Китайка Долго, Москва | |
| 81 | <i>Fusarium</i> sp. | | Кора, Москва | |
| 82 | <i>Fusarium sporotrichioides</i> | | Плод, Москва | |
| 83 | <i>Monilia fructigena</i> | | Плод яблони Китайка Долго, Москва | |
| 84 | <i>Venturia pirina</i> ГМ | | Груша | Плод груши сорта Москвичка, Москва |
| 85 | <i>Venturia pirina</i> ГБП | | | Плод груши сорта Белорусская поздняя, Москва |
| 86 | <i>Fusarium babinda</i> F-846 | Дыня | Молдавия | |
| 87 | <i>Fusarium</i> sp. 1.6 | Липа | Ветвь, Москва | |
| 88 | <i>Fusarium</i> sp. 3.2 | | Ветвь, Москва | |
| 89 | <i>Cytospora</i> sp. 1.8 | | Ветвь, Москва | |
| 90 | <i>Cytospora</i> sp. 1.2 | | Ветвь, Москва | |
| 91 | <i>Phomopsis</i> sp. 4.1 | | Ветвь, Москва | |
| 92 | <i>Phomopsis</i> 6.2 | | Ветвь, Москва | |
| 93 | <i>Verticillium</i> sp. 3.1 | | Ветвь, Москва | |
| 94 | <i>Thyrostroma</i> sp. 8.2 | | Ветвь, Москва | |
| 95 | <i>Fusarium torulosum</i> F-1178 | Псевдотсуга | Португалия | |
| 96 | <i>Phomopsis</i> sp. | Туя | Ветвь, Московская область | |
| 97 | <i>Phomopsis juniperivora</i> | | Ветвь, Московская область | |
| 98 | <i>Pestalotiopsis funerea</i> | | Стебель, Московская область | |
| 99 | <i>Fusarium avenaceum</i> F-133 | Сосна | Ризосфера проростка, остров Сахалин | |
| 100 | <i>Colletorichum</i> sp. | Кофе | Лист, Коста-Рика | |
| 101 | <i>Fusarium</i> sp. | | Ягода, Коста-Рика | |
| 102 | <i>Botrytis cinerea</i> Д7 | Роза | Бутон, Москва | |
| 103 | <i>Phoma lavandulae</i> | Лаванда | Стебель, Крым | |
| 104 | <i>Tubercularia vulgaris</i> | Грецкий орех | Кора, Москва | |
| 105 | <i>Alternaria tenuis</i> | - | Москва, Ботанический сад | |
| 106 | <i>Fusarium equiseti</i> | | Москва | |
| 107 | <i>Fusarium oxysporum</i> F-55071 | | Минск | |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|--|
| 108 | <i>Fusarium sambucinum</i> | | Москва |
| ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ | | | |
| 109 | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 101 | Томат | Стебель, гибрид Рианто, г. Великие Луки |
| 110 | <i>Pectobacterium carotovorum</i> 480 | Томат | Краснодарский край |
| 111 | <i>Pseudomonas syringae</i> БИМ В-280 | Соя | Растение, Минск |
| 112 | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> | Томат | Стебель, гибрид Верлиока F1, Санкт-Петербург |
| 113 | <i>Xanthomonas arboricola</i> В-614 | - | Москва |
| 114 | <i>Xanthomonas arboricola</i> В-620 | Грецкий орех | Растение, Москва |
| 115 | <i>Xanthomonas arboricola</i> В-628 | Чернослив | Растение, Москва |
| 116 | <i>Xanthomonas campestris</i> В-610 | Рапс | Растение, Москва |
| 117 | <i>Xanthomonas perforans</i> В-624 | Аргемона | Растение, Москва |
| 118 | <i>Xanthomonas pisi</i> В-633 | - | Москва |
| 119 | <i>Xanthomonas vasicola</i> В-618 | Бухарник | Растение, Москва |