

# Ризобактерии для снижения биотического стресса яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), вызванного фитопатогенными грибами

Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Российская Федерация

## КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Людмила Константиновна Асякина  
E-mail: alk\_kem@mail.ru

## ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

## ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Серазетдинова, Ю.Р., Фотина, Н.В., Асякина, Л.К., Милентьева, И.С., & Просеков, А.Ю. (2023). Ризобактерии для снижения биотического стресса яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), вызванного фитопатогенными грибами. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (4), 98–113. <https://doi.org/10.36107/spfr.2023.4.515>

ПОСТУПИЛА: 02.07.2023

ПРИНЯТА: 15.12.2023

ОПУБЛИКОВАНА: 30.12.2023

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

Ю. Р. Серазетдинова, Н. В. Фотина, Л. К. Асякина, И. С. Милентьева, А. Ю. Просеков

## АННОТАЦИЯ

**Введение:** Урожайность пшеницы в значительной степени зависит от фитопатогенной нагрузки почв и семенного материала. В сложных климатических условиях Кузбасса актуален поиск биологических средств защиты пшеницы для обеспечения продовольственной безопасности региона.

**Цель исследования** — оценить ростостимулирующие свойства и антагонистическую активность бактериальных изолятов ризосферы пшеницы, и отобрать перспективные варианты для создания коммерческих препаратов биофунгицидной направленности.

**Материалы и методы:** Для выделения перспективных штаммов ризобактерий использовали последовательное культивирование ризосферы пшеницы на безазотистой питательной среде, на среде с труднорастворимым соединением фосфора и на среде с низким содержанием питательных элементов. Для отбора репрезентативных изолятов исследовали индекс всхожести семян; способность к фиксации азота и солюбилизации фосфора. Для изолятов, характеризующихся высокой активностью, исследовали способность синтезировать фитогормоны спектрофотометрическим методом и антагонистическую активность в отношении фитопатогенов методом агаровых блоков. Идентификацию перспективных ризобактерий осуществляли по биохимическим признакам. Исследование влияния бактериальных изолятов на рост и развитие пшеницы в условиях биотического стресса осуществляли согласно общепринятым методикам.

**Результаты:** В ходе исследования выделили 17 изолятов, 2 из которых характеризовались максимальной активностью по ростостимулирующим и антагонистическим показателям. Биохимическая идентификация показала, что ими являлись *Bacillus velezensis* и *Pantoea ananatis*. Для *Bacillus velezensis* характерны следующие ростостимулирующие свойства: фиксация азота (850 мкг/мл), солюбилизация фосфора (1,60 см), индекс всхожести (1,26), синтез индолил-3-уксусной кислоты (8,16 мг/мл), гиббереллиновой кислоты (366,90 мкг/мл) и кинетина (11,86 мкг/мл). Штамм *Pantoea ananatis* проявлял следующие ростостимулирующие свойства: фиксация азота (80 мкг/мл), солюбилизация фосфора (2,00 см), индекс всхожести (1,19), синтез индолил-3-уксусной кислоты (9,00 мг/мл), гиббереллиновой кислоты (346,20 мкг/мл) и кинетина (6,28 мкг/мл). Штаммы обладали высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* F-877, *Botrytis cinerea* F-1006, *Bipolaris sorokiniana* F-529. Испытания штаммов на зараженных фитопатогенами семенах пшеницы показали, что они успешно снижают биотический стресс растений.

**Выводы:** Перспективно дальнейшее использование штаммов в качестве агентов биологического контроля для разработки комплексных препаратов, направленных на улучшение питания пшеницы.

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

*Fusarium graminearum*; *Botrytis cinerea*; *Bipolaris sorokiniana*; фитогормоны; стимулирующие рост растений бактерии; антагонистическая активность; Кузбасс



# Rhizobacteria for Reducing Biotic Stress in Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Caused by Phytopathogenic Fungi

Kemerovo State University, Kemerovo,  
Russian Federation

Yuliya R. Serazetdinova, Natalya V. Fotina, Lyudmila K. Asyakina,  
Irina S. Milentyeva, Alexander Yu. Prosekov

## CORRESPONDENCE:

Lyudmila Konstantinovna Asyakina

E-mail: v\_kondratenko@vnimi.org

## DATA AVAILABILITY:

Data from the current study are available upon request from the corresponding author.

## FOR CITATIONS:

Serazetdinova, Yu.R., Fotina, N.V., Asyakina, L.K., Milentyeva, I.S., & Prosekov, A.Yu. (2023). Rhizobacteria for reducing biotic stress in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) caused by Phytopathogenic Fungi. *Storage and Processing of Farm Products*, (4), 98–113. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.4.515>

RECEIVED: 02.07.2023

ACCEPTED: 15.12.2023

PUBLISHED: 30.12.2023

## DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.

## FUNDING

The research was carried out within the framework of the state assignment "Fundamental research on the development of biopesticides consisting of extremophilic and endophytic microorganisms, to overcome abiotic and biotic stress in agricultural crops in the conditions of the Kemerovo region-Kuzbass" (code FZSR-2023-0003).

## ABSTRACT

**Introduction:** Wheat is an important agricultural crop. Its yield largely depends on the phytopathogenic load of soils and seed material. In the difficult climatic conditions of Kuzbass, the search for biological means of protecting wheat is relevant to ensure food security in the region.

**Purpose** of the study is to evaluate the growth-stimulating properties and antagonistic activity of bacterial isolates of the wheat rhizosphere, and to select promising options for the creation of commercial biofungicidal preparations.

**Materials and Methods:** To isolate promising strains of rhizobacteria, we used sequential cultivation of the wheat rhizosphere on a nitrogen-free nutrient medium, on a medium with a sparingly soluble phosphorus compound, and on a medium with a low content of nutrients. To select representative isolates, the seed germination index was examined; ability to fix nitrogen and solubilize phosphorus. For isolates characterized by high activity, the ability to synthesize phytohormones was studied using the spectrophotometric method and antagonistic activity against phytopathogens using the agar block method. Identification of promising rhizobacteria was carried out based on biochemical characteristics. The study of the effect of bacterial isolates on the growth and development of wheat under biotic stress conditions was carried out according to generally accepted methods.

**Results:** During the study, 17 isolates were isolated, 2 of which were characterized by maximum activity in terms of growth-stimulating and antagonistic indicators. Biochemical identification showed that they were *Bacillus velezensis* and *Pantoea ananatis*. *Bacillus velezensis* is characterized by the following growth-stimulating properties: nitrogen fixation (850 µg/ml), phosphorus solubilization (1.60 cm), germination index (1.26), synthesis of indolyl-3-acetic acid (8.16 mg/ml), gibberellic acid (366.90 µg/ml) and kinetin (11.86 µg/ml). The *Pantoea ananatis* strain exhibited the following growth-stimulating properties: nitrogen fixation (80 µg/ml), phosphorus solubilization (2.00 cm), germination index (1.19), synthesis of indolyl-3-acetic acid (9.00 mg/ml), gibberellic acid (346.20 µg/ml) and kinetin (6.28 µg/ml). The strains had high antagonistic activity against the phytopathogenic fungi *Fusarium graminearum* F-877, *Botrytis cinerea* F-1006, *Bipolaris sorokiniana* F-529. Testing of the strains on wheat seeds infected with phytopathogens showed that they successfully reduce plant biotic stress.

**Conclusions:** The further use of strains as biological control agents for the development of complex preparations aimed at improving wheat nutrition is promising.

## KEYWORDS

*Fusarium graminearum*; *Botrytis cinerea*; *Bipolaris sorokiniana*; phytohormones; plant growth stimulating bacteria; antagonistic activity; Kuzbass



## ВВЕДЕНИЕ

Пшеница (*Triticum* spp.) является стратегически важным культурным растением, принадлежащим к семейству *Poaceae*. Среди возделываемых зерновых культур она занимает лидирующие позиции в современном мировом земледелии по посевным площадям (более 218 миллионов га) (Giraldo et al., 2019). Популярность культуры связана с высокой пищевой и биологической ценностью. Известно, что пшеница богата углеводами, белками, минеральными веществами, жирами и витаминами (Carcea, 2020).

В Кузбассе пшеница занимает лидирующее место в обеспечении продовольственной безопасности, и является наиболее часто возделываемой зерновой культурой. Однако сложные климатические условия региона повышают подверженность растений инфекционным заболеваниям, способствуют снижению урожайности и качества зерна (Плотников & Латкова, 2020). Наибольший урон качеству и количеству урожая наносят фитопатогены грибной природы, в особенности представители рода *Fusarium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Botrytis* и *Drechslera* (El-Gremi et al., 2017). Для снижения негативного воздействия фитопатогенов на растения наиболее часто применяют вещества химической природы, что приводит к проблемам для окружающей среды и здоровья, а также к развитию резистентности к фунгицидам (Brauer et al., 2019). Использование ризобактерий является одним из альтернативных методов эффективной и безопасной борьбы с фитопатогенами (Parashar et al., 2023).

Ризобактерии, стимулирующие рост растений, представляют собой свободноживущие почвенные бактерии, которые обладают способностью колонизировать ризосферу и/или поверхность корней растений и улучшать их рост и урожайность (Ranadev et al., 2019). В основном это происходит за счет высвобождения метаболитов, обладающих ростостимулирующими свойствами (Фасхутдинова с соавт., 2023). Механизмы положительного влияния ризобактерий в отношении растений включают:

- (1) синтез фитогормонов, таких как индол-3-уксусная кислота (ИУК), гиббереллины и цитокинины (Husna et al., 2023; Martynenko et al., 2022);

- (2) фиксацию азота  $N_2$  или усиление ассимибиотической фиксации (Khumairah et al., 2020; Nining et al., 2021; Renoud et al., 2020);
- (3) солюбилизацию неорганических соединений (Batool & Iqbal, 2019; Gupta et al., 2021; Dinesh et al., 2022);
- (4) антагонистическое действие в отношении фитопатогенных микроорганизмов за счет продуцирования сидерофоров, антибиотиков и ферментов, а также конкуренции за питательные вещества (Karthika et al., 2020; Nining et al., 2021; Pellegrini et al., 2020; Ren et al., 2020).

Выявление перспективных ризосферных бактерий и использование их для борьбы с фитопатогенами является актуальным способом увеличения урожайности и качества пшеницы с минимально возможными экологическими рисками. Цель данного исследования — оценить ростостимулирующую и антагонистическую активность бактериальных изолятов, выделенных из ризосферы пшеницы, для дальнейшего создания коммерческих препаратов биофунгицидной направленности. Новизна исследования заключается в выделении местных штаммов ризобактерий, адаптированных к почвенно-климатическим условиям Кемеровской области — Кузбасса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы

Ризобактерии выделяли из яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Отбор образцов ризосферы пшеницы осуществляли на территории Кемеровской области — Кузбасса (координаты места отбора 55.2778, 86.1619).

### Оборудование

Шейкер-инкубатор LSI-3016A/LSI-3016R (Daihan Labtech, Южная Корея), автоматический микробиологический анализатор Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция), климатическая камера (Binder, Германия), Rapid N cube (Rapid, Германия), спектрофотометр UV 1800 (Shimadzu, Япония).

## Выделение ризобактерий и их характеристика

Для выделения ризобактерий 5 г измельченной ризосферы пшеницы культивировали в 100 мл питательной среды, не содержащей источников азота, следующего состава, г/л: сахара (Ленреактив, Россия) — 20,0; калийфосфорнокислый 2-замещенный (Chem-ех, Россия) — 1,0; магний сернокислый (Химбаза, Россия) — 5,0; натрий хлористый (Ленреактив, Россия) — 5,0; натрий молибденовокислый (Ленреактив, Россия) — 0,005; железо (II) сернокислое (Chem-ех, Россия) — 0,01; кальцийглютексилый (Ленреактив, Россия) — 2,0. Инкубировали в шейкере-инкубаторе LSI-3016A/LSI-3016R (Daihan Labtech, Южная Корея) в течение 48 ч при 27–30 °C и скорости перемешивания 120 об/мин.

Далее осуществляли инкубирование полученной культуральной жидкости в питательной среде, содержащей труднорастворимое соединение фосфора. Для этого 5 мл полученной культуральной жидкости вносили в 100 мл питательной среды следующего состава, г/л: глюкоза (Химреактивы, Россия) — 20,0; натрий хлористый — 0,2; магний сернокислый — 0,1; марганец сернокислый (Ленреактив, Россия) — 0,01; железо (II) сернокислое — 0,01 г; кальций фосфорнокислый (Ленреактив, Россия) — 5,0. Вышеперечисленные способы позволяют выделить бактерии, характеризующиеся способностью к фиксации атмосферного азота и солюбилизации фосфатов — одних из основных свойств стимулирующих рост растений ризобактерий.

Для выделения ризобактерий, способных проявлять активность в обедненных почвах с низким содержанием питательных элементов, инкубировали полученную ранее культуральную жидкость в среде следующего состава, г/л: калий фосфорнокислый 1-замещенный (Chem-ех, Россия) — 15,0; натрий хлористый — 2,5; аммоний хлористый (Химбаза, Россия) — 5,0. Культивировали в условиях, описанных выше. Для получения чистых культур использовали 5-ти кратный пересев истощающим штрихом на чашках Петри с мясо-пептонным агаром.

### Оценка влияния изолятов на индекс всхожести семян пшеницы

По 10 семян пшеницы помещали в две чашки Петри с увлажненными дисками фильтровальной бу-

маги. В одной из чашек семена обрабатывали 15 мл бактериальной суспензии (коэффициента мутности по МакФарланду 1,5) и выращивали в течение 72 ч в климатической камере (Binder, Германия) при температуре 25 °C и влажности 40%. Индекс всхожести рассчитывали по формуле 1 (Migunova et al., 2021):

$$\text{ИВ} = \frac{D_{\text{обр}}}{D_{\text{необр}}},$$

где ИВ — индекс всхожести;  $D_{\text{обр}}$  — длина ростков обработанных семян, см;  $D_{\text{необр}}$  — длина ростков необработанных семян, см.

### Способность к солюбилизации фосфора

Суточную культуру исследуемых бактерий высевали точно на агаризованную среду с труднорастворимым соединением фосфора. Состав среды аналогичен среде используемой на этапе выделения. Культивирование осуществляли в течение 96 ч при температуре 27–30 °C (Belkebla et al., 2022). Способность культуры солюбилизовать фосфор оценивали путем измерения зоны гало вокруг колонии.

### Способность к фиксации азота

Суспензию исследуемых штаммов готовили в 3 мл стерильного физиологического раствора до коэффициента мутности 0,8–1,0 по МакФарланду (титр микроорганизмов  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл) с помощью денситометра. Далее 1 мл суспензии высевали на жидкую среду, не содержащую азот, используемую на этапе выделения ризосферных бактерий. Культивировали в течение 4 суток при температуре 27–30 °C. Далее отделяли культуральную жидкость (КЖ) от клеток с помощью центрифугирования при скорости 8000 об/мин в течение 25 мин, следуя методологии, описанной в Cordova-Rodriguez et al. (2022). Для определения содержания азота в КЖ использовали установку Rapid N cube (Rapid, Германия).

### Способность к продуцированию кинетина

1 мл ранее полученной суспензии добавляли к 10 мл жидкой питательной среды следующего состава (г/л): калий фосфорнокислый 1-замещенный — 12; натрий фосфорнокислый 2-замещенный (Ленреактив, Россия) — 24; аммоний хлористый — 4; натрий хлористый — 2; тиамин (Химреактивы, Россия) — 0,1;

биотин (Диа-М, Россия) — 0,0002. Культивировали в течение 48 ч при температуре 27–30 °С и скорости вращения 120 об/мин. Отделяли клетки от КЖ по методике, описанной ранее и определяли оптическую плотность на спектрофотометре UV 1800 (Shimadzu, Япония) при длине волны 665 нм, в качестве раствора сравнения использовали питательную среду (Patel & Saraf, 2017). Количество синтезируемого кинетина определяли по калибровочному графику стандартного раствора кинетина в пределах от 5 до 100 мкг/мл.

#### **Анализ способности продуцировать индолил-3-уксусную кислоту**

Один мл ранее полученной суспензии добавляли в 10 мл среды Лурия-Бертани. Культивирование микроорганизмов проводили в условиях, описанных в методике определения кинетина. Отделение клеток от КЖ проводили в соответствии с методикой определения азотфиксации. Далее смешивали супернатант с реактивом Сальковского в соотношении 1:1 и оставляли на 30 мин. По истечении времени измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 535 нм. В качестве раствора сравнения использовали питательную среду с реактивом Сальковского в соотношении 1:1 (Asyakina, Vorob'eva et al., 2023). Количество ИУК определяли по калибровочному графику стандартных растворов ИУК концентрации от 5 до 200 мкг/мл.

#### **Анализ способности продуцировать гиббереллиновую кислоту (ГК)**

К 2 мл супернатанта, полученного при анализе на ИУК, добавляли по 280 мкл 10,6 % ферроцианида III калия и 1 М раствор цинка уксуснокислого и встряхивали. Затем центрифугировали в течение 10 мин при скорости 4500 об/мин. Далее 2 мл полученного супернатанта смешивали с 2 мл 30 % соляной кислоты. Раствор выдерживали при комнатной температуре в течение 75 мин и измеряли оптическую плотность при длине волны 254 нм. В качестве раствора сравнения использовали питательную среду с 5 % соляной кислотой в соотношении 1:1. Количество синтезируемой ГК определяли по калибровочному графику стандартного раствора в пределах от 20 до 400 мкг/мл (Abdenaceur et al., 2022).

#### **Анализ антагонистической активности**

Использовали следующие штаммы фитопатогенов: *Fusarium graminearum* F-877, *Botrytis cinerea* F-1006, *Bipolaris sorokiniana* F-529. Данные микроорганизмы культивировали в пробирке с картофельно-глюкозным агаром. Далее фитопатоген засекали поверхностно методом «газона», используя суспензии мутностью 0,5–0,6 по Мак-Фарланду. Суточную культуру исследуемых бактерий, выращенных на бульоне Лурия-Бертани, высевали глубинным способом на агаризованную среду Лурия-Бертани и инкубировали в течение 24 ч при температуре 27–30 °С. Затем вырезали агаровый блок с исследуемой культурой и вставляли его в лунку агарового диска другой чашки Петри с засеянными фитопатогенами. Чашки Петри выдерживали в течение 8 ч в холодильнике при температуре +5 °С для диффузии метаболитов культур бактерий из блока в толщу агара с тест-культурой, а затем инкубировали в термостате при 26–28 °С (Ржевская с соавт., 2021).

#### **Определение культуральных признаков**

Готовили суспензию чистых культур низкой концентрации, проводили посев глубинным способом на мясо-пептонный агар и культивировали в условиях, описанных в Цугкиев и Мкртычан (2013).

#### **Определение морфологических признаков**

Фиксированный мазок бактерии окрашивали по методу Грама. Далее микроскопировали с объективом x90 или x100 (Кулясов и Халгаева, 2020).

#### **Определение биохимических признаков**

Биохимические признаки выделенных микроорганизмов изучали с помощью автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция) с использованием карт ID-GN (грамотрицательные микроорганизмы) и ID-GP (грамположительные микроорганизмы). Культуры выращивали на колумбийском агаре с кровью в течение 48 ч при температуре 25–27 °С, затем готовили суспензию штаммов с коэффициентом мутности по МакФарланду в пределах 0,50–0,63 с использованием денситометра Densichek plus (Sendle, Россия) (Voitenkova et al., 2018).

## Изучение влияния бактериального изолята на рост и развитие пшеницы

Семена пшеницы предварительно стерилизовали в 5% растворе гипохлорита натрия в течение 10 мин, 5-кратно промывали стерильной дистиллированной водой и сушили в течение 2 ч в стерильных условиях ламинарного бокса («Ламинарные системы», Россия). Далее часть семян инфицировали путем обработки в суспензии фитопатогена с коэффициентом мутности 0,3 по Мак-Фарланду в течение 2 ч, после чего высушивали в стерильных условиях. Бактериальную суспензию готовили в стерильном физиологическом растворе с коэффициентами 0,5; 1,5 и 2,5 по Мак-Фарланду. Семена обрабатывали аналогично вышеуказанной методики. После обработки семена просушивали и осуществляли посев 50 семян в горшок объемом 0,45 л. Семена инкубировали в климатической камере (Binder, Германия) при температуре 25 °C и влажности 40% (Asyakina, Serazetdinova et al., 2023). На 11 сутки измеряли длину ростка и корня, а также их массы. Варианты обработки семян:

Неинфицированный контроль — без обработки.

Инфицированный контроль — обработка суспензией фитопатогена.

Вариант 1 — обработка суспензиями фитопатогена и ризобактерии (коэффициент мутности 0,5 по Мак-Фарланду).

Вариант 2 — обработка суспензиями фитопатогена и ризобактерии (коэффициент мутности 1,5 по Мак-Фарланду).

Вариант 3 — с обработкой суспензиями фитопатогена и ризобактерии (коэффициент мутности 2,5 по Мак-Фарланду).

## Статистическая обработка полученных результатов

Все исследования проводили в пятикратной повторности. Полученные значения выражали как среднее значение пяти измерений со стандартным отклонением. Анализ статистических данных осуществляли при помощи программного про-

дукта Microsoft Office Excel 2007 (12.0.6612.1000) SP3 MSO (12.0.6607.1000) (Microsoft corporation, США). Статистический анализ полученных данных проводили с помощью одномоментного парного критерия Стьюдента, по каждой паре интересов. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Выделение ризобактерий и их характеристика

Из ризосферы пшеницы выделили 17 чистых культур микроорганизмов (№ 1–17). В таблице 1 представлены результаты оценки способности изолятов к фиксации азота, солюбилизации фосфатов, а также их влияние на рост пшеницы (индекс всхожести семян).

Таблица 1

Результаты изучения способности бактериальных штаммов фиксировать азот, солюбилизировать фосфаты и влиять на всхожесть семян

| Изолят | Содержание азота, мкг/мл | Солюбилизация фосфатов, см | Индекс всхожести семян |
|--------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| 1      | 850 ± 10                 | 1,60 ± 0,10                | 1,26 ± 0,03            |
| 2      | 840 ± 10                 | 2,00 ± 0,10                | 1,19 ± 0,03            |
| 3      | 820 ± 20                 | 0,70 ± 0,10                | 0,95 ± 0,02            |
| 4      | 800 ± 10                 | 1,20 ± 0,10                | 1,13 ± 0,02            |
| 5      | 790 ± 10                 | 1,60 ± 0,20                | 1,15 ± 0,04            |
| 6      | 780 ± 10                 | 0,40 ± 0,10                | 0,84 ± 0,02            |
| 7      | 760 ± 10                 | 1,30 ± 0,10                | 1,08 ± 0,02            |
| 8      | 760 ± 10                 | 0,50 ± 0,10                | 0,91 ± 0,03            |
| 9      | 750 ± 20                 | 1,30 ± 0,10                | 0,97 ± 0,03            |
| 10     | 710 ± 10                 | 1,60 ± 0,10                | 0,95 ± 0,02            |
| 11     | 690 ± 10                 | 2,20 ± 0,20                | 0,89 ± 0,02            |
| 12     | 670 ± 20                 | 0,50 ± 0,10                | 0,74 ± 0,02            |
| 13     | 670 ± 10                 | 1,50 ± 0,10                | 0,84 ± 0,03            |
| 14     | 660 ± 20                 | 0,50 ± 0,10                | 0,62 ± 0,01            |
| 15     | 400 ± 10                 | 2,00 ± 0,30                | 0,87 ± 0,03            |
| 16     | 320 ± 10                 | 1,00 ± 0,10                | 0,79 ± 0,02            |
| 17     | 300 ± 10                 | 0,70 ± 0,10                | 0,65 ± 0,02            |

Полученные данные свидетельствуют о том, что все изученные штаммы обладают способностью фиксировать азот и солюбилизировать фосфор. Некоторые штаммы также оказали положительное влияние на прорастание семян пшеницы. Наиболее оптимальные свойства демонстрировали изоляты 1; 2; 4; 5 и 7: способность к фиксации азота (850 мкг/мл, 840 мкг/мл, 800 мкг/мл, 780 мкг/мл, 760 мкг/мл соответственно), солюбилизация фосфатов (1,6 см; 2,0 см, 1,2 см; 1,6 см; 1,3 см соответственно) и ростостимулирующий эффект (индекс всхожести > 1). Данные изоляты отобраны для проведения дальнейших исследований.

На следующем этапе изучили способность изолятов синтезировать индолил-3-уксусную и гиббереллиновую кислоты, кинетин. Также оценили антагонистическую активность отобранных штаммов в отношении фитопатогенных грибов *Fusarium graminearum* F-877, *Botrytis cinerea* F-1006, *Bipolaris sorokiniana* F-529. Результаты представлены в Таблицах 2 и 3.

**Таблица 2**

Концентрация индолил-3-уксусной кислоты, гиббереллиновой кислоты и кинетина в культуральной жидкости изолятов

| Изолят | ИУК, мг/мл  | ГК, мкг/мл   | Кинетин, мкг/мл |
|--------|-------------|--------------|-----------------|
| 1      | 8,16 ± 0,19 | 366,9 ± 10,5 | 11,86 ± 0,31    |
| 2      | 9,00 ± 0,25 | 346,2 ± 9,3  | 9,56 ± 0,28     |
| 4      | 8,57 ± 0,22 | 286,3 ± 8,4  | 6,28 ± 0,15     |
| 5      | 7,10 ± 0,20 | 342,9 ± 10,1 | 6,87 ± 0,14     |
| 7      | 4,49 ± 0,11 | 408,9 ± 11,3 | 8,25 ± 0,22     |

**Таблица 3**

Результаты оценки антагонистической активности выделенных бактериальных культур по отношению к фитопатогенным грибам

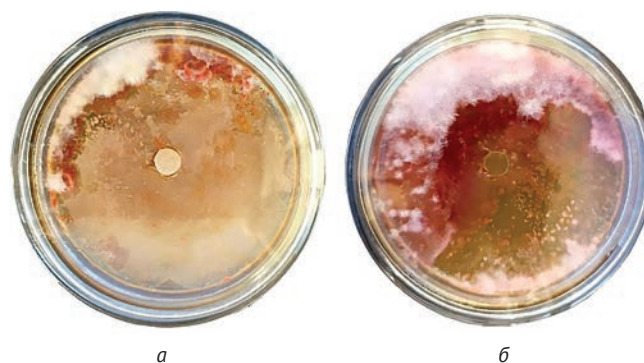
| Изолят | Фитопатоген, см |           |           |
|--------|-----------------|-----------|-----------|
|        | F-877           | F-1006    | F-529     |
| 1      | 9,5 ± 0,3       | 9,0 ± 0,2 | 6,8 ± 0,2 |
| 2      | 9,2 ± 0,2       | 7,1 ± 0,2 | 6,5 ± 0,1 |
| 4      | 9,2 ± 0,2       | 4,3 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 |
| 5      | 5,6 ± 0,2       | 1,2 ± 0,1 | —         |
| 7      | 5,9 ± 0,1       | 4,3 ± 0,1 | —         |

Согласно представленным результатам, штаммы 1 и 2 продуцируют наибольшее количество индолил-3-уксусной кислоты — 8,16 мг/мл и 9,00 мг/мл соответственно, наименьшей способностью к продуцированию ИУК обладал штамм 7—4,49 мг/мл. Способностью продуцировать ГК обладали все выделенные штаммы, концентрация фитогормона находилась в пределах от 286,3 мкг/мл до 408,9 мкг/мл. Наилучшие показатели по синтезу данного фитогормона продемонстрировал штамм 7—408,9 мкг/мл, наименьшей активностью обладал штамм 4—286,3 мкг/мл. Штаммы 1; 2 и 5 показали средние результаты — 366,6 мкг/мл; 346,2 мкг/мл и 342,9 мкг/мл соответственно. Кинетин является важным показателем, так как является регулятором роста растений. Лидирующие позиции в его синтезе продемонстрировали три изолята, а именно 1 (11,86 мкг/мл), 2 (9,56 мкг/мл) и 7 (8,25 мкг/мл).

Анализ антагонистической активности штаммов показал, что изоляты 5 и 7 не оказывают ингибирующее воздействие на *F-529*. В связи с этим дальнейшие исследования данных штаммов не проводили. Из исследований также исключили изолят 4, так как его способность к синтезу ростостимулирующих веществ значительно уступала изолятам 1 и 2. Наибольшую антагонистическую активность в отношении всех фитопатогенов демонстрировали изоляты 1 и 2. Результаты исследования антагонистической активности изолятов, представлены на Рисунках 1–3.

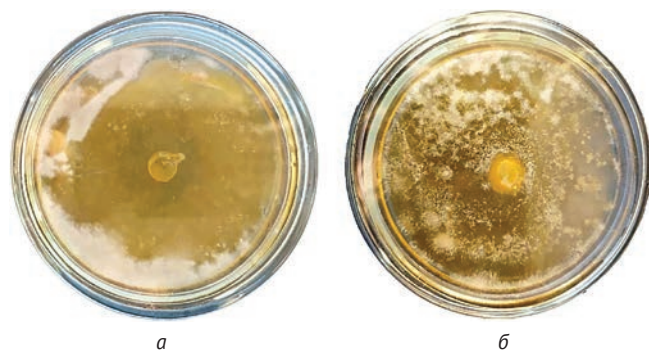
**Рисунок 1**

Результаты антагонистической активности изолята 1 (а) и изолята 2 (б) в отношении фитопатогена *Fusarium graminearum* F-877



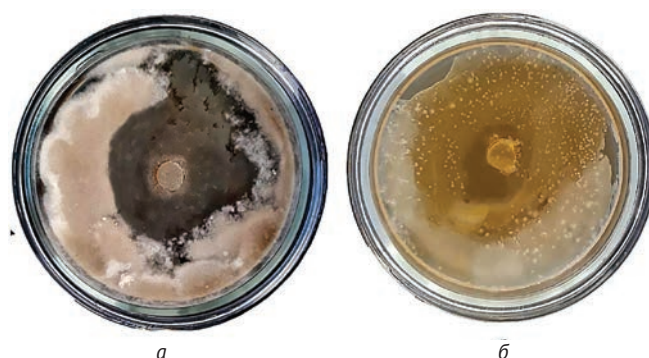
**Рисунок 2**

Результаты антагонистической активности изолята 1 (а) и изолята 2 (б) в отношении фитопатогена *Botrytis cinerea* F-1006



**Рисунок 3**

Результаты антагонистической активности изолята 1 (а) и изолята 2 (б) в отношении фитопатогена *Bipolaris sorokiniana* F-529



Для наиболее перспективных изолятов провели оценку культурально-морфологических признаков. Характер роста изолятов на плотных питательных средах представлен на Рисунке 4.

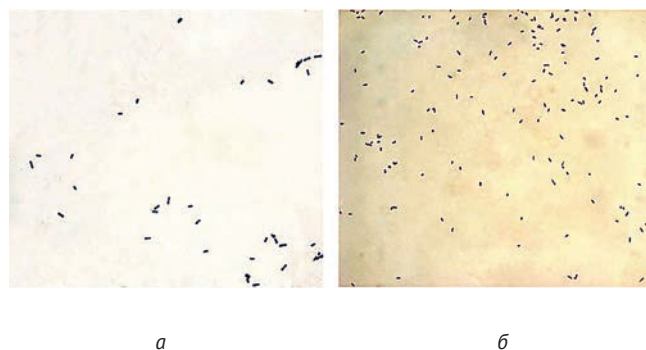
**Рисунок 4**

Характер роста изолятов на питательных средах, где (а) изолят 1; (б) изолят 2



**Рисунок 5**

Микроскопия изолятов при увеличении  $\times 100$  (а) изолят 1; (б) изолят 2



Колонии изолята 1 — белого цвета с круглым краем и матовой фактурой, у изолята 2 — желтого цвета с круглым краем и масляной фактурой. Также изучили морфологические признаки культур. Результаты микроскопического исследования представлены на Рисунке 5.

Микроскопические исследования показали, что изолят 1 представлен грамположительными палочками размером  $(4.1-5.4) \times (0.5-0.8)$  мкм. Изолят 2 — граммотрицательные палочки размером  $(3-3.5) \times (0.2-0.3)$  мкм. Идентификацию изолятов проводили на основании их биохимических характеристик. Результаты представлены в Таблице 4.

**Таблица 4**

Биохимические признаки изолятов

| Изолят | Сахара, ферментируемые изолятом                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | D-Amygdalin, D-Ribose, Optochin Resistance, L-Lactate alkalization, Growth in 6.5 % NaCl, D-Sorbitol, D-Mannitol, Salicin, Arginine Dihydrolase 1, Alpha-Galactosidase, N-Acetyl-D-Glucosamine, D-Mannose, Saccharose/Sucrose, L-Pyrrolydonyl-Arylamidase, D-Maltose, Methyl-B-D-Glucopyranoside, D-Trehalose, Alpha-Glucosidase, Bacitracin Resistance |
| 2      | L-pyrrolydonyl arylamidase, D-glucose, Fermentation/glucose, Beta-glucosidase, D-mannitol, D-mannose, D-sorbitol, Saccharose/sucrose, D-trehalose, Malonate, L-Lactate alkalisation, Phosphatase, Coumarate                                                                                                                                             |

Согласно полученным данным изолят 1 принадлежит к виду *Bacillus velezensis* с достоверностью 96 %, изолят 2 — *Pantoea ananatis* с достоверностью 93 %.

## Изучение влияния бактериального изолята на рост и развитие пшеницы

На следующем этапе исследования изучали способность *Bacillus velezensis* и *Pantoea ananatis* снижать негативное воздействие *Fusarium graminearum*

F-877, *Botrytis cinerea* F-1006 и *Bipolaris sorokiniana* F-529 на рост и развитие пшеницы. Результаты представлены в Таблицах 5 и 6.

**Таблица 5**

Результаты изучения ростостимулирующей активности *Bacillus velezensis* в условиях биотического стресса

| Наименование              | Средняя длина, мм               |                                 | Средняя масса, мг               |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                           | Корень                          | Побег                           | Корень                          | Побег                           |
| <i>Патоген F-1006</i>     |                                 |                                 |                                 |                                 |
| Контроль неинфицированный | 86 ± 4                          | 148 ± 7                         | 103 ± 4                         | 121 ± 6                         |
| Контроль инфицированный   | 61 ± 3                          | 105 ± 5                         | 87 ± 4                          | 101 ± 5                         |
| Вариант 1                 | 72 ± 3                          | 115 ± 5                         | 91 ± 4                          | 116 ± 6                         |
|                           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|                           | $T_{st1} = 2,80$<br>$p = 0,026$ | $T_{st1} = 3,84$<br>$p = 0,006$ | $T_{st1} = 2,12$<br>$p = 0,071$ | $T_{st1} = 0,59$<br>$p = 0,574$ |
|                           | $T_{st2} = 2,59$<br>$p = 0,036$ | $T_{st2} = 1,41$<br>$p = 0,200$ | $T_{st2} = 0,71$<br>$p = 0,502$ | $T_{st2} = 1,92$<br>$p = 0,096$ |
| Вариант 2                 | 81 ± 4                          | 122 ± 5                         | 101 ± 4                         | 120 ± 6                         |
|                           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|                           | $T_{st1} = 1,00$<br>$p = 0,350$ | $T_{st1} = 2,82$<br>$p = 0,025$ | $T_{st1} = 0,88$<br>$p = 0,406$ | $T_{st1} = 0,12$<br>$p = 0,909$ |
|                           | $T_{st2} = 4,00$<br>$p = 0,005$ | $T_{st2} = 2,40$<br>$p = 0,047$ | $T_{st2} = 2,47$<br>$p = 0,042$ | $T_{st2} = 2,43$<br>$p = 0,045$ |
| Вариант 3                 | 82 ± 4                          | 136 ± 7                         | 104 ± 5                         | 122 ± 6                         |
|                           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|                           | $T_{st1} = 0,80$<br>$p = 0,450$ | $T_{st1} = 1,21$<br>$p = 0,264$ | $T_{st1} = 0,16$<br>$p = 0,880$ | $T_{st1} = 0,12$<br>$p = 0,909$ |
|                           | $T_{st2} = 4,20$<br>$p = 0,004$ | $T_{st2} = 3,60$<br>$p = 0,008$ | $T_{st2} = 2,65$<br>$p = 0,032$ | $T_{st2} = 2,43$<br>$p = 0,045$ |
| <i>Патоген F-877</i>      |                                 |                                 |                                 |                                 |
| Контроль неинфицированный | 82 ± 4                          | 152 ± 7                         | 101 ± 5                         | 125 ± 6                         |
| Контроль инфицированный   | 62 ± 3                          | 102 ± 5                         | 88 ± 4                          | 110 ± 5                         |
| Вариант 1                 | 80 ± 4                          | 125 ± 5                         | 89 ± 5                          | 116 ± 6                         |
|                           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|                           | $T_{st1} = 0,35$<br>$p = 0,734$ | $T_{st1} = 3,14$<br>$p = 0,016$ | $T_{st1} = 1,70$<br>$p = 0,133$ | $T_{st1} = 1,06$<br>$p = 0,324$ |
|                           | $T_{st2} = 3,60$<br>$p = 0,009$ | $T_{st2} = 2,83$<br>$p = 0,025$ | $T_{st2} = 0,16$<br>$p = 0,880$ | $T_{st2} = 0,70$<br>$p = 0,507$ |
| Вариант 2                 | 88 ± 4                          | 148 ± 6                         | 107 ± 5                         | 124 ± 6                         |
|                           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|                           | $T_{st1} = 1,06$<br>$p = 0,324$ | $T_{st1} = 0,43$<br>$p = 0,677$ | $T_{st1} = 0,85$<br>$p = 0,424$ | $T_{st1} = 0,12$<br>$p = 0,909$ |
|                           | $T_{st2} = 5,20$<br>$p = 0,001$ | $T_{st2} = 5,51$<br>$p = 0,001$ | $T_{st2} = 2,97$<br>$p = 0,020$ | $T_{st2} = 1,79$<br>$p = 0,116$ |
| Вариант 3                 | 94 ± 5                          | 161 ± 7                         | 120 ± 6                         | 143 ± 5                         |
|                           |                                 |                                 |                                 |                                 |
|                           | $T_{st1} = 2,03$<br>$p = 0,08$  | $T_{st1} = 0,91$<br>$p = 0,393$ | $T_{st1} = 2,43$<br>$p = 0,045$ | $T_{st1} = 2,30$<br>$p = 0,054$ |
|                           | $T_{st2} = 5,49$<br>$p = 0,001$ | $T_{st2} = 6,51$<br>$p = 0,001$ | $T_{st2} = 4,44$<br>$p = 0,003$ | $T_{st2} = 4,67$<br>$p = 0,002$ |

Окончание Таблицы 5

| Наименование              | Средняя длина, мм |         | Средняя масса, мг |         |
|---------------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
|                           | Корень            | Побег   | Корень            | Побег   |
| <i>Патоген F-529</i>      |                   |         |                   |         |
| Контроль неинфицированный | 87 ± 4            | 140 ± 6 | 114 ± 5           | 125 ± 6 |
| Контроль инфицированный   | 68 ± 3            | 110 ± 5 | 91 ± 5            | 106 ± 5 |
| Вариант 1                 | 85 ± 4            | 139 ± 6 | 115 ± 5           | 128 ± 5 |
|                           |                   |         |                   |         |
| Вариант 2                 | 101 ± 4           | 145 ± 6 | 119 ± 5           | 130 ± 6 |
|                           |                   |         |                   |         |
| Вариант 3                 | 106 ± 5           | 149 ± 7 | 126 ± 5           | 136 ± 6 |
|                           |                   |         |                   |         |

Примечание.  $T_{st1}$  — значение  $t$ -критерий Стьюдента при сравнении изучаемого варианта обработки с неинфицированным контролем,  $T_{st2}$  — значение  $t$ -критерий Стьюдента при сравнении изучаемого варианта обработки с инфицированным контролем

Таблица 6

Результаты изучения ростостимулирующей активности *Pantoea ananatis* в условиях биотического стресса

| Наименование                   | Средняя длина, мм |         | Средняя масса, мг |         |
|--------------------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
|                                | Корень            | Побег   | Корень            | Побег   |
| <i>Botrytis cinerea F-1006</i> |                   |         |                   |         |
| Контроль неинфицированный      | 89 ± 5            | 145 ± 7 | 103 ± 5           | 122 ± 4 |
| Контроль инфицированный        | 63 ± 2            | 109 ± 6 | 82 ± 2            | 106 ± 4 |
| Вариант 1                      | 75 ± 4            | 113 ± 6 | 94 ± 4            | 108 ± 6 |
|                                |                   |         |                   |         |
| Вариант 2                      | 81 ± 5            | 125 ± 3 | 99 ± 5            | 121 ± 3 |
|                                |                   |         |                   |         |
| Вариант 3                      | 92 ± 5            | 149 ± 4 | 101 ± 5           | 123 ± 4 |
|                                |                   |         |                   |         |

| Наименование                | Средняя длина, мм |                                 |         |                                 | Средняя масса, мг |                                 |         |                                 |
|-----------------------------|-------------------|---------------------------------|---------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------|---------------------------------|
|                             | Корень            |                                 | Побег   |                                 | Корень            |                                 | Побег   |                                 |
| Fusarium graminearum F-877  |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Контроль неинфицированный   | 81 ± 4            |                                 | 134 ± 5 |                                 | 100 ± 3           |                                 | 126 ± 3 |                                 |
| Контроль инфицированный     | 68 ± 3            |                                 | 118 ± 4 |                                 | 87 ± 5            |                                 | 111 ± 3 |                                 |
| Вариант 1                   | 79 ± 3            | $T_{st1} = 0,40$<br>$p = 0,701$ | 126 ± 3 | $T_{st1} = 1,37$<br>$p = 0,212$ | 79 ± 3            | $T_{st1} = 0,40$<br>$p = 0,701$ | 126 ± 3 | $T_{st1} = 1,37$<br>$p = 0,212$ |
|                             |                   | $T_{st2} = 2,59$<br>$p = 0,036$ |         | $T_{st2} = 1,60$<br>$p = 0,154$ |                   | $T_{st2} = 2,59$<br>$p = 0,036$ |         | $T_{st2} = 1,60$<br>$p = 0,154$ |
|                             |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Вариант 2                   | 85 ± 4            | $T_{st1} = 0,71$<br>$p = 0,502$ | 148 ± 3 | $T_{st1} = 2,40$<br>$p = 0,047$ | 85 ± 4            | $T_{st1} = 0,71$<br>$p = 0,502$ | 148 ± 3 | $T_{st1} = 2,40$<br>$p = 0,047$ |
|                             |                   | $T_{st2} = 3,40$<br>$p = 0,011$ |         | $T_{st2} = 6,00$<br>$p = 0,001$ |                   | $T_{st2} = 3,40$<br>$p = 0,011$ |         | $T_{st2} = 6,00$<br>$p = 0,001$ |
|                             |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Вариант 3                   | 91 ± 3            | $T_{st1} = 2,00$<br>$p = 0,085$ | 159 ± 6 | $T_{st1} = 3,20$<br>$p = 0,015$ | 91 ± 3            | $T_{st1} = 2,00$<br>$p = 0,085$ | 159 ± 6 | $T_{st1} = 3,20$<br>$p = 0,015$ |
|                             |                   | $T_{st2} = 5,42$<br>$p = 0,001$ |         | $T_{st2} = 5,69$<br>$p = 0,001$ |                   | $T_{st2} = 5,42$<br>$p = 0,001$ |         | $T_{st2} = 5,69$<br>$p = 0,001$ |
|                             |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Bipolaris sorokiniana F-529 |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Контроль неинфицированный   | 86 ± 4            |                                 | 139 ± 5 |                                 | 102 ± 5           |                                 | 125 ± 5 |                                 |
| Контроль инфицированный     | 64 ± 3            |                                 | 115 ± 5 |                                 | 86 ± 4            |                                 | 108 ± 5 |                                 |
| Вариант 1                   | 80 ± 4            | $T_{st1} = 1,06$<br>$p = 0,324$ | 128 ± 5 | $T_{st1} = 1,56$<br>$p = 0,163$ | 118 ± 5           | $T_{st1} = 2,26$<br>$p = 0,058$ | 126 ± 5 | $T_{st1} = 0,14$<br>$p = 0,891$ |
|                             |                   | $T_{st2} = 3,40$<br>$p = 0,011$ |         | $T_{st2} = 1,84$<br>$p = 0,108$ |                   | $T_{st2} = 2,26$<br>$p = 0,058$ |         | $T_{st2} = 2,55$<br>$p = 0,038$ |
|                             |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Вариант 2                   | 98 ± 4            | $T_{st1} = 2,12$<br>$p = 0,071$ | 135 ± 5 | $T_{st1} = 0,57$<br>$p = 0,589$ | 125 ± 5           | $T_{st1} = 3,25$<br>$p = 0,014$ | 129 ± 5 | $T_{st1} = 0,57$<br>$p = 0,589$ |
|                             |                   | $T_{st2} = 7,00$<br>$p = 0,001$ |         | $T_{st2} = 2,83$<br>$p = 0,025$ |                   | $T_{st2} = 3,25$<br>$p = 0,014$ |         | $T_{st2} = 2,97$<br>$p = 0,020$ |
|                             |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |
| Вариант 3                   | 102 ± 5           | $T_{st1} = 2,50$<br>$p = 0,041$ | 140 ± 5 | $T_{st1} = 0,14$<br>$p = 0,891$ | 128 ± 6           | $T_{st1} = 2,94$<br>$p = 0,021$ | 131 ± 5 | $T_{st1} = 0,85$<br>$p = 0,424$ |
|                             |                   | $T_{st2} = 6,69$<br>$p = 0,001$ |         | $T_{st2} = 3,54$<br>$p = 0,009$ |                   | $T_{st2} = 3,33$<br>$p = 0,012$ |         | $T_{st2} = 3,25$<br>$p = 0,014$ |
|                             |                   |                                 |         |                                 |                   |                                 |         |                                 |

Примечание.  $T_{st1}$  — значение  $t$ -критерий Стьюдента при сравнении изучаемого варианта обработки с неинфицированным контролем,  $T_{st2}$  — значение  $t$ -критерий Стьюдента при сравнении изучаемого варианта обработки с инфицированным контролем

Полученные данные свидетельствуют о том, что *Pantoea ananatis* в варианте обработки 2 и 3 значительно снижает негативный эффект биотического стресса, вызванного *Botrytis cinerea* F-1006.

При обработке данными концентрациями наблюдается статистически достоверное увеличение длины и массы корней и побегов в сравнении с инфицированным контролем. Обработка

также уменьшала негативное воздействие фитопатогенов *Fusarium graminearum* F-877 и *Bipolaris sorokiniana* F-529. При этом статистически достоверного увеличения показателей роста в сравнении с неинфицированным контролем не наблюдалось во всех вариантах экспериментах.

Фитопатоген *Bacillus velezensis* также успешно снижал стресс, вызванный негативным воздействием *Botrytis cinerea* F-1006, *Fusarium graminearum* F-877 и *Bipolaris sorokiniana* F-529. Статистически достоверное улучшение ростовых показателей наблюдалось при всех вариантах обработки (в сравнении с инфицированным контролем). У семян, зараженных *Bipolaris sorokiniana* F-529 при 3 варианте обработки, длина и масса корней были выше, чем у неинфицированного контроля.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ризобактерии находят все большее применение в качестве агентов защиты сельскохозяйственных культур благодаря антагонистической активности в отношении фитопатогенов и ростостимулирующей активности. В настоящей работе изучены свойства двух наиболее перспективных изолятов ризосферы пшеницы, произрастающей на территории Кемеровской области — Кузбасса. Биохимический анализ показал, что изолят 1 являлся *Bacillus velezensis*, а изолят 2 — *Pantoea ananatis*. Полученные нами данные согласуются с результатами других ученых. Например, Chen и соавторы подтвердили, что *B. velezensis* проявляет антагонистическую активность в отношении *F. graminearum* (Chen et al., 2018). Torres и соавторы сообщили о способности *Bacillus velezensis* XT1 фиксировать азот, продуцировать сидерофоры, а также солиubilизировать органические и неорганические фосфаты (Torres et al., 2020), что также согласуется с полученными нами данными.

Перспективные свойства представителей *Bacillus velezensis* описаны в современной научной литературе. Так, штамм *B. velezensis* LM2303 способен синтезировать три антибиотика (фенгицин В, итурин А и сурфактин А), активных в отношении патогенов грибной природы (Chen et al., 2018). Антагонистические свойства штамма не ограничиваются антифунгицидной активностью. Его метаболический профиль включает антибактери-

альные вещества, такие как сурфактин А, бутирозин, плантазолицин и гидролизированный плантазолицин, кианимицин, бацилизин, диффицидин, бациллен А и бациллен В, 7-о-малонил макролактин А и 7-о-сукцинил макролактин А, сидерофор бациллибактин, молибденовый кофактор и тейхуроновую кислоту (Chen et al., 2018). В связи с этим можно предположить, что штамм *Bacillus velezensis*, выделенный в рамках нашей работы, также может проявлять антибактериальные свойства. Однако для подтверждения данной гипотезы требуется проведение дополнительных исследований. При этом следует учесть, что антагонистические свойства *B. velezensis* могут быть обусловлены не только антимикробными метаболитами. Так, Fazle и Baek отметили, что представители *B. velezensis* способны активировать защитные гены растений. В частности авторы наблюдали экспрессию генов, связанных с синтезом жасминовой и салициловой кислот (Fazle & Baek, 2020).

Актуальны исследования выделенных штаммов ризобактерий в полевых условиях. При этом особенно важно оценить влияние обработки бактериальной суспензией штаммов на микробиом почв. Данные, полученные Sun и соавторами, свидетельствуют о том, что представители *Bacillus velezensis* синтезируют аминокислоты с разветвленной цепью, которые участвуют в синтрофическом сотрудничестве. В связи с этим штамм может стимулировать развитие желательной микрофлоры. Данное свойство штамма перспективно для сельского хозяйства, так как колонизация стимулирующими рост растений микроорганизмами увеличивает продуктивность сельскохозяйственных культур (Sun et al., 2022).

Особенный интерес представляет дальнейшее изучение выделенного в настоящем исследовании штамма *Pantoea ananatis*. Представители рода *Pantoea* наиболее известны за счет фитопатогенных свойств (Azizi et al., 2019; Toaza et al., 2021; Toh et al., 2019). Отличия в генетических последовательностях вирулентных штаммов *Pantoea ananatis* и штамма, выделенного в настоящем исследовании, могут пролить свет на механизмы вирулентности. Известно, что мутантные штаммы *Pantoea ananatis* с инактивированным геном *hfq* демонстрировали потерю вирулентности и подвижности (Shin et al., 2019).

Описание не вирулентных представителей *Pantoea* также встречаются в современной научной литературе. Например, в исследовании Lu et al. (2021) *Pantoea ananatis* D1 проявлял множество свойств, способствующих росту растений, включая солюбилизацию фосфатов, выработку индолил-3-уксусной кислоты, дезаминазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и сидерофоров. Штамм *Pantoea ananatis* HCR2 способствовал росту салата за счет солюбилизации фосфора и производства дезаминазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, индолил-3-уксусной кислоты и сидерофоров (Liu et al., 2021[1]). Эти сведения согласуются с результатами проведенного нами исследования.

Следует отметить, что в настоящей работе мы фокусировались на изучении конкретных штаммов *Bacillus velezensis* и *Pantoea ananatis*, поэтому полученные данные нельзя проецировать на других представителей данных видов. Кроме того, наше исследование проводилось исключительно на пшенице. Поэтому воздействие этих штаммов на другие культуры растений остается неизвестным и требует дальнейших исследований. Полученные результаты представляют собой отправную точку для развития биотехнологического направления, связанного с использованием микробных биопрепаратов в качестве комбинированных удобрений и средств защиты для злаковых культур в органическом сельском хозяйстве. Дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на подробном изучении механизмов воздействия этих биопрепаратов на пшеницу, а также на взаимодействии между штаммами ризобактерий. Это позволит оптимизировать их эффективность и разработать комплексные препараты на их основе. Также важным аспектом является анализ продуцируемых штаммами метаболитов для полного понимания этих механизмов. Для получения более полной картины о влиянии выделенных ризобактерий на качественные и количественные изменения в разнообразии микробиоты почвы необходимо провести метагеномные исследования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данного исследования являлась оценка ростостимулирующей и антагонистической активности бактериальных изолятов, выделенных из ризосферы пшеницы, для дальнейшего созда-

ния коммерческих препаратов биофунгицидной направленности.

В Кемеровской области — Кузбассе из ризосферы пшеницы выделено 17 штаммов. На основании оценки их ростостимулирующих свойств (фиксации азота, солюбилизации фосфатов, стимуляции роста пшеницы, синтеза фитогормонов) и антагонистической активности выявили два перспективных штамма: *Bacillus velezensis* (изолят 1) и *Pantoea ananatis* (изолят 2).

Исследование на растениях показало, что эти штаммы эффективно снижают стресс от фитопатогенов, включая *Fusarium graminearum* F-877, *Botrytis cinerea* F-100 и *Bipolaris sorokiniana* F-529. Обработка суспензией *Bacillus velezensis* увеличивала длину и массу корней проростков семян, зараженных *Bipolaris sorokiniana* F-529.

Эти штаммы демонстрируют потенциал для борьбы с грибковыми инфекциями пшеницы и могут быть использованы для создания комплексного препарата, так как способны фиксировать азот (*Bacillus velezensis* — 850 мкг/мл, *Pantoea ananatis* — 840 мкг/мл) и солюбилизовать фосфаты (*Bacillus velezensis* — 1,60 см, *Pantoea ananatis* — 2,00 см). Таким образом, цель исследования достигнута в полном объеме. Следует отметить, что сведения о ростостимулирующих свойствах *Pantoea ananatis* стали неожиданным открытием, так как род *Pantoea* наиболее известен в контексте фитопатогенных свойств. Авирулентность штамма может быть обусловлена контактом с другими микроорганизмами (горизонтальный перенос генов) или результатом адаптации к определенным почвенно-климатическим условиям.

Будущие исследования могут сосредоточиться на анализе метаболитов для понимания механизмов воздействия на растения, а также на изучении взаимодействия между штаммами, чтобы усилить их эффективность. Штаммы будут зарегистрированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» для дальнейшего коммерческого использования.

## АВТОРСКИЙ ВКЛАД

**Юлия Ренатовна Серазетдинова:** проведение исследования.

**Наталья Вячеславовна Фотина:** проведение исследования.

**Людмила Константиновна Асякина:** создание черновика рукописи, руководство исследованием.

**Ирина Сергеевна Милентьева:** разработка методологии исследования.

**Александр Юрьевич Просеков:** редактирование рукописи.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Кулясов, П. А., Халгаева, К. Э. (2020). Окрашивания усовершенствованным методом по Ганс Кристиану Граму для идентификации живого биологического возбудителя ракового новообразования молочной железы кошки. *Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии*, 3, 28–34.
- Kulyasov, P. A., & Khalgaeva, K. E. (2020). Staining by the improved method according to Hans Christian Gram for the identification of the living biological agent of cancerous neoplasm of the cat's mammary gland. *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*, 3, 28–34. (In Russ.)
- Плотников, С. Е., Латкова, Е. В. (2020). Перспективы эффективности возделывания яровой пшеницы (на примере Кузбасса). *Инновационная наука*, 4, 79–81.
- Plotnikov, S. E., & Latkova, E. V. (2020). Prospects for the efficiency of spring wheat cultivation (the case of Kuzbass). *Innovative Science*, 4, 79–81. (In Russ.)
- Ржевская, В. С., Семенова, Е. Ф., Зайцев, Г. П., Сластья, Е. А., Омелченко, А. В., Бугара, И. А., Теплицкая, Л. М., Цокало, И. Е. (2021). Антагонистическое действие молочнокислых бактерий и их консорциума с дрожжами на патогенные микроорганизмы. *Биотехнология*, 37(5), 96–107. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-96-107>
- Rzhevskaya, V. S., Semenova, E. F., Zaitsev, G. P., Slastya, E. A., Omelchenko, A. V., Bugara, I. A., Teplitskaya, L. M., & Tsokalo, I. E. (2021). Antagonistic action of lactic acid bacteria and their consortium with yeasts against pathogenic microorganisms. *Biotechnology*, 37(5), 96–107. (In Russ.) <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-96-107>
- Фасхутдинова, Е. Р., Голубцова, Ю. В., Неверова, О. А., Ларичев, Т. А., Хорошкина, Н. Н. (2023). Перспективы использования эндофитных и экстремофильных микроорганизмов в борьбе с фитопатогенами сельскохозяйственных культур (обзор). *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*, 24(5), 720–738. <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.5.720-738>
- Faskhutdinova, E. R., Golubtsova, Yu. V., Neverova, O. A., Larichev, T. A., & Khoroshkina, N. N. (2023). Prospects for the use of endophytic and extremophilic microorganisms in the fight against phytopathogens of agricultural crops (review). *Agrarian Science of Euro-North-East*, 24(5), 720–738. (In Russ.) <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2023.24.5.720-738>
- Цугкиев, Б. Г., Мкртычан, М. В. (2013). Морфологические и культуральные свойства микроорганизмов, выделенных из пищеварительного тракта диких животных. *Известия Горского государственного аграрного университета*, 50(3), 270–273.
- Tsugkiev, B. G., & Mkrtchyan, M. V. (2013). Morphological and cultural properties of microorganisms isolated from the digestive tract of wild animals. *News of the Gorsky State Agrarian University*, 50(3), 270–273. (In Russ.)
- Abdenaceur, R., Farida, B. T., Mourad, D., Rima, H., Zahia, O., Fatma, S. H. (2022). Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. *International Microbiology*, 25(4), 817–829. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00263-8>
- Asyakina, L. K., Serazetdinova, Yu. R., Frolova, A. S., Fotina, N. V., Neverova, O. A., & Petrov, A. N. (2023). Antagonistic activity of extremophilic bacteria against phytopathogens in agricultural crops. *Food Processing: Techniques and Technology*, 53(3), 565–575. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-3-2457>
- Asyakina, L. K., Vorob'eva, E. E., Proskuryakova, L. A., Zharko, M. Yu. (2023). Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions. *Foods and Raw Materials*, 11(1), 162–171. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-556>
- Azizi, M. M. F., Zulperi, D., Rahman, M. A. A., Abdal-Basir, B., Othman, N. A., Ismail, S. I., Hata, E. M., Ina-Salwany, M. Y., & Abdullah, M. A. F. (2019). First report of *Pantoea ananatis* causing leaf blight disease of rice in peninsular Malaysia. *Plant Disease*, 103, Article 2122. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-19-0191-PDN>
- Batool, S., & Iqbal, A. (2019). Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 1400–1410. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.024>
- Belkebla, N., Bessai, S. A., Melo, J., Caeiro, M. F., Cruz, C., & Nabti, E.-h. (2022). Restoration of *Triticum aestivum* growth under salt stress by phosphate-solubilizing bacterium isolated from Southern Algeria. *Agronomy*, 12(9), Article 2050. <https://doi.org/10.3390/agronomy12092050>
- Brauer, V. S., Rezende, C. P., Pessoni, A. M., De Paula, R. G., Rangappa, K. S., Nayaka, S. C., Gupta, V. K., & Almeida, F. (2019). Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules*, 9, Article 521. <https://doi.org/10.3390/biom9100521>

- Carcea, M. (2020). Nutritional value of grain-based foods. *Foods*, 9(4), Article 504. <https://doi.org/10.3390/foods9040504>
- Chen, L., Heng, J., Qin, S., & Bian, K. (2018). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against Fusarium head blight. *PLoS One*, 13, Article e0198560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>
- Cordova-Rodriguez, A., Rentería-Martínez, M. E., López-Miranda, C. A., Guzmán-Ortiz, J. M., & Moreno-Salazar, S. F. (2022). Simple and sensitive spectrophotometric method for estimating the nitrogen-fixing capacity of bacterial cultures. *MethodsX*, 9, Article 101917. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101917>
- Dinesh, R., Srinivasan, V., Praveena, R., Subila, K. P., George, P., Das, A., Shajina, O., Anees, K., Leela, N. K., & Haritha, P. (2022). Exploring the potential of P solubilizing rhizobacteria for enhanced yield and quality in turmeric (*Curcuma longa* L.). *Industrial Crops and Products*, 189, Article 115826. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115826>
- El-Gremi, S. M., Draz, I. S., & Youssef, W. A.-E. (2017). Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protection*, 91, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.034>
- Fazle, R. M., & Baek, K.-H. (2020). Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules*, 25, Article 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
- Giraldo, P., Benavente, E., Manzano-Agugliaro, F., & Gimenez, E. (2019). Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy*, 9, Article 352. <https://doi.org/10.3390/agronomy9070352>
- Gupta, R., Anshu, Noureldeen, A., & Darwish, H. (2021). Rhizosphere mediated growth enhancement using phosphate solubilizing rhizobacteria and their tri-calcium phosphate solubilization activity under pot culture assays in Rice (*Oryza sativa*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28, 3692–3700. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.052>
- Husna, Hussain, A., Shah, M., Hamayun, M., Iqbal, A., Qadir, M., Alataway, A., Dewidar, A. Z., Elansary, H. O., & Lee, I.-J. L. (2023). Phytohormones producing rhizobacteria alleviate heavy metals stress in soybean through multilayered response. *Microbiological Research*, 266, Article 127237. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127237>
- Karthika, S., Varghese, S., & Jisha, M. S. (2020). Exploring the efficacy of antagonistic rhizobacteria as native biocontrol agents against tomato plant diseases. *3 Biotech*, 10, Article 320. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02306-1>
- Khumairah, F. H., Setiawati, M. R., Fitriatin, B. N., Simarmata, T., Alfajar, S., Ansari, M. J., Enshasy, H. A. E., Sayyed, R. Z., & Najafi, S. (2020). Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria isolated from saline soil improve nitrogen fixation and alleviate salt stress in rice plants. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 905210. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.905210>
- Liu, X., Chen, C., Wang, J., Zou, S., & Long, X. (2021). Phosphorus solubilizing bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Pantoea ananatis* simultaneously promote soil inorganic phosphate dissolution and soil Pb immobilization. *Rhizosphere*, 20, Article 100448. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100448>
- Lu, L., Chang, M., Han, X., Wang, Q., Wang, J., Yang, H., Guan, Q., & Dai, S. (2021). Beneficial effects of endophytic *Pantoea ananatis* with ability to promote rice growth under saline stress. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 1919–1931. <https://doi.org/10.1111/jam.15082>
- Martynenko, E., Arkhipova, T., Safronova, V., Seldimirova, O., Galin, I., Akhtyamova, Z., Veselov, D., Ivanov, R., & Kudoyarova, G. (2022). Effects of phytohormone-producing rhizobacteria on casparian band formation, ion homeostasis and salt tolerance of durum wheat. *Biomolecules*, 12, Article 230. <https://doi.org/10.3390/biom12020230>
- Migunova, V. D., Tomashevich, N. S., Konrat, A. N., Lychagina, S. V., Dubyaga, V. M., D'Addabbo, T., Sasanelli, N., & Asaturova, A. M. (2021). Selection of bacterial strains for control of root-knot disease caused by *Meloidogyne incognita*. *Microorganisms*, 9, Article 1698. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081698>
- Nining, H., Elkawakib, S., Burhanuddin, R., & Feranita, H. (2021). Isolation and characterization of N-fixing and IAA producing rhizobacteria from two rice field agro-ecosystems in South Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22, 2497–2503. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220506>
- Parashar, M., Dhar, S. K., Kaur, J. A., Chauhan, A., Tamang, J., Singh, G. B., Asyakina, L., Perveen, K., Khan, F., Bukhari, N. A., Mudgal, G., & Gururani, M. A. (2023). Two novel plant-growth-promoting *Lelliottia amnigena* isolates from *Euphorbia prostrata* Aiton enhance the overall productivity of wheat and tomato. *Plants*, 12, Article 3081. <https://doi.org/10.3390/plants12173081>
- Patel, T., & Saraf, M. (2017). Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their *in vitro* plant growth-promoting efficacy. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 480–487. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1392625>
- Pellegrini, M., Ercole, C., Zio, C. D., Matteucci, F., Pace, L., & Gallo, M. D. (2020). *In vitro* and *in planta* antagonistic effects of plant growth-promoting rhizobacteria consortium against soilborne plant pathogens of *Solanum tuberosum* and *Solanum lycopersicum*. *FEMS Microbiology Letters*, 367, Article fnaa099. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa099>
- Ranadev, P., Nagaraju, K., Ramaiah, M., & Kumari, R. (2019). Studies on isolation, characterization and in-vitro screening of plant growth promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 790–803. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.806.096>
- Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J., & Li, P. (2020). Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: Inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins*, 12, Article 24. <https://doi.org/10.3390/toxins12010024>
- Renoud, S., Bouffaud, M.-L., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Legendre, L., Moëgne-Loccoz, Y., & Muller, D. (2020). Co-occurrence of rhizobacteria with nitrogen fixation

- and/or 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deamination abilities in the maize rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), Article fiae062. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae062>
- Shin, G. Y., Schachterle, J. K., Shyntum, D. Y., Moleleki, L. N., Coutinho, T. A., & Sundin, G. W. (2019). Functional characterization of a global virulence regulator Hfq and identification of Hfq-dependent sRNAs in the plant pathogen *Pantoea ananatis*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, Article 2075. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02075>
- Sun, X., Xu, Z., Xie, J., Hesselberg-Thomsen, V., Tan, T., Zheng, D., Strube, M. L., Dragoš, A., Shen, Q., Zhang, R., & Kovács, Á.T. (2022). *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions. *ISME Journal*, *16*, 774–787. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01125-3>
- Toaza, A., Caiza, R. B., Garrido, A. D., Moreno, C. R., Guevara, J., Regalado, H., Flores, F. J., Ramos, L. A., & Garrido, P. A. (2021). First report of *Pantoea ananatis* causing leaf spot disease of maize in Ecuador. *Plant Disease*, *105*, Article 3286. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-21-0298-pdn>
- Toh, W. K., Loh, P. C., & Wong, H. L. (2019). First report of leaf blight of rice caused by *Pantoea ananatis* and *Pantoea dispersa* in Malaysia. *Plant Disease*, *103*, 1764–1764. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2299-PDN>
- Torres, M., Llamas, I., Torres, B., Toral, L., Sampedro, I., & Béjar, V. (2020). Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*, *150*, Article 103453. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103453>
- Voitenkova, E. V., Matveeva, Z. N., Makarova, M. A., & Egorovaets, S. A. (2018). Difficulties in identification of *Comamonas kerstersii* strains isolated from intestinal microbiota of residents of the Republic of Guinea and Russian federation. *Russian Journal of Infection and Immunity*, *8*(2), 164–168. <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-163-168>