

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.64

**Новые штаммы бактерий *Pseudomonas laurentiana* – перспективные агенты для агробиотехнологии****Г.Ф. Рафикова\* , Е.В. Кузина, Т.Ю. Коршунова, О.Н. Логинов***Уфимский Институт биологии, Уфимский федеральный исследовательский центр, РАН, 450054, г. Уфа, просп. Октября, д. 69, лит. Е**\*e-mail: rgf07@mail.ru*

Из активного ила биологических очистных сооружений были выделены штаммы бактерий АНТ 17 и АНТ 56, обладающие способностью к подавлению роста фитопатогенного гриба *Bipolaris sorokiniana*. Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств, а также нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и состава жирных кислот клеточных стенок показало принадлежность штаммов АНТ 17 и АНТ 56 к виду *Pseudomonas laurentiana*. Было установлено, что штаммы – *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 – обладают комплексом свойств, характерных для PGP-микроорганизмов (от англ. plant growth-promoting – способствующие росту растений): проявляют антигрибную активность в отношении фитопатогенных микромицетов, способны к разложению фосфатов и синтезу фитогормональных веществ. Инокуляция обоими штаммами семян растений огурца, томата и капусты оказывала благоприятное воздействие на их всхожесть. Предпосевная обработка семян пшеницы в условиях естественного инфекционного фона инокулятом выделенных штаммов бактерий способствовала снижению распространения грибов, вызывающих корневые гнили. Предполагается возможность применения штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 в биотехнологии с целью повышения продуктивности агроэкосистем. Способность к стимулированию роста и развития растений для штаммов вида *P. laurentiana* показана впервые.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas laurentiana*, PGP-микроорганизмы, ген 16S рРНК, антигрибная активность, индолилуксусная кислота, цитокинины

Род *Pseudomonas* на сегодняшний день является наиболее многочисленной группой граммотрицательных бактерий и включает более 191 вида. Представители рода обладают широкими метаболическими возможностями и являются обитателями различных сред и источников, таких как вода, почва, растения, животные. Они выполняют функции, связанные с разложением органических веществ, стимулированием роста растений и др., а также могут оказывать патогенное воздействие [1].

Среди псевдомонад большое количество штаммов, относящихся к группе PGPR (от англ. plant growth-promoting rhizobacteria – ризобактерии, способствующие росту растений). PGPR могут усиливать рост растений с помощью самых разнообразных механизмов: биологической фиксации азота, солюбилизации фосфатов, синтеза фитогормонов, сидерофоров, антибиотических веществ, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазы, летучих органических соединений, индукции системной устойчивости и др. [2]. В почве PGPR могут эффективно конкурировать с аборигенной микробиотой, приживаться в ризосфере растений и затем функционировать в особых условиях данной экосистемы [3].

В настоящей работе представлено описание таксономического положения и комплекса полезных для растений свойств у двух новых PGP-штаммов рода *Pseudomonas*, которые в рамках данного исследования были идентифицированы как представители вида *P. laurentiana*. Этот вид был открыт относительно недавно [4], и его типовой штамм описан как микроорганизм, способный к окислению Mn(III). Способность к стимулированию роста и развития растений для штаммов вида *P. laurentiana* показана впервые.

**Материалы и методы**

Объектами исследования служили штаммы бактерий: АНТ 17 – выделенный из проб активного ила биологических очистных сооружений нефтеперерабатывающего предприятия, расположенного в г. Орск (Оренбургская область); АНТ 56 – выделенный из проб активного ила биологических очистных сооружений предприятия, являющегося крупным производителем кальцинированной, пищевой и каустической соды в России (г. Стерлитамак, Республика Башкортостан).

Бактерии рода *Pseudomonas* выделяли на жидкой среде Козера с 0,1% соли пировиноградной кислоты в качестве источника углерода [5].

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов определяли по общепринятым методикам [6] при выращивании на мясопептонном агаре (МПА) и селективных средах Кинг А и Кинг Б [5]. Первичную идентификацию бактерий проводили согласно определителю Берджи [7].

Аmplификацию гена 16S рРНК осуществляли с использованием универсальных праймеров [8]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 3730» (Applied Biosystems, США). Поиск нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК, гомологичных соответствующим последовательностям исследуемого штамма, и расчет их попарного сходства проводили с помощью сервера EzBioCloud (<http://ezbiocloud.net>) [9]. Дендрограммы филогенетического сходства строили в программе MEGA X [10] методом neighbor-joining [11] с использованием двухпараметрической модели Кимура [12].

Состав жирных кислот клеточных стенок исследуемых штаммов определяли с помощью идентификационной системы Sherlock 6.1 (MIDI; Microbial ID) в соответствии с техническими инструкциями этой системы [13].

Наличие способности к синтезу индолилуксусной кислоты (ИУК) и цитокининоподобных веществ выявляли с помощью иммуноферментного анализа так, как описано ранее [14].

Антагонистические свойства выделенных штаммов бактерий в отношении фитопатогенных микромицетов оценивали в условиях *in vitro* методом совместного культивирования в чашках Петри [15]. Засеянные чашки инкубировали в течение 72 ч при 28°C. В качестве тест-организмов, обладающих фитопатогенной активностью, использовали *Fusarium avenaceum* ВКМ 132, *F. culmorum* ВКМ 844, *F. gibbosum* ВКМ 848, *F. nivale* ВКМ 3106, *F. oxysporum* ВКМ 137, *F. semitectum* ВКМ 1938, *F. solani* ВКМ 142, *Bipolaris sorokiniana* ИБ Г-12. Последняя культура является местным изолятом и хранится в Коллекции микроорганизмов Уфимского Института биологии Уфимского федерального исследовательского центра (УФИЦ) РАН.

Для изучения влияния железа на антигрибные свойства бактериальных штаммов проводили сравнение антагонистической активности бактерий на среде Кинг Б в отсутствие  $\text{FeCl}_3$  и при добавлении 100 мкг/мл  $\text{FeCl}_3$ .

Способность к гидролизу фосфатов изучали на средах Пиковской (состав (г/л):  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  – 5,0; глюкоза – 20,0;  $\text{NaCl}$  – 0,2;  $\text{MgSO}_4$  – 0,1;  $\text{MnSO}_4$  – следы;  $\text{FeSO}_4$  – следы, агар-агар – 20,0) и Муромцева (состав (г/л): глюкоза – 10; аспара-

гин – 1;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,2; кукурузный экстракт – 0,02; агар-агар – 20; свежесажженный  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  – 1,5).

Для определения влияния бактериализации штаммами на всхожесть семян сельскохозяйственных культур использовали семена растений томата, огурца и капусты. Для обработки использовали разбавленную культуру бактерий (титр  $\sim 10^5$  КОЕ/мл), выращенных на питательной среде Кинг Б. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде. Всхожесть семян определяли на вторые и четвертые сутки.

Изучение эффективности штаммов-антагонистов против комплекса возбудителей корневых гнилей проводили в лабораторных условиях на семенах мягкой яровой пшеницы (всхожесть 90,7%) с естественным уровнем заражения посевного материала спорами фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *B. sorokiniana*. В качестве эталонов использовали биопрепарат «Ризоплан» (0,5 л/т), основу которого составляет штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* AP-33. Через 7 сут учитывали распространение и развитие корневых гнилей проростков, а также распространение на семенах альтернариоза. Статистическую обработку данных проводили с использованием MS Excel. В таблицах данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

**Скрининг.** В результате скрининга были выделены штаммы, обладающие способностью к росту на селективной среде для псевдомонад и образованию флуоресцирующих пигментов. Основным критерием для дальнейшего отбора бактерий являлась способность штаммов к подавлению роста фитопатогенного гриба *B. sorokiniana*, вызывающего гельминтоспориозные корневые гнили, темно-бурую пятнистость листьев, симптом «черного зародыша», сажистый налет на колосьях злаковых культур. В результате было отобрано два штамма – АНТ 17 и АНТ 56 – с наиболее высокой степенью антагонистической активности.

**Идентификация новых PGP-штаммов.** Клетки изучаемых штаммов АНТ 17 и АНТ 56 – грам-отрицательные подвижные палочки, не образующие споры. На плотной питательной среде МПА колонии округлые с ровными краями, гладкие, слабывпуклые, непрозрачные, серовато-белые, диаметром 5–7 мм. На МПА и среде Кинг Б образуют желто-зеленый флуоресцирующий пигмент. На диагностической среде Кинг А образование синего пигмента не отмечено. На скошенном мясопептонном агаре штрих сплошной, с ровными краями. На жидкой среде (мясопептонный бульон) штамм АНТ 17 образует обильный, плотный, дискообразный осадок; штамм АНТ 56 – обильный, хлопьевидный осадок и тонкую, сплошную, рых-

люю пленку. Каталазо- и оксидазоположительные, метаболизм – дыхательный. Оптимальная температура роста – 28°C, растут при 4°C и в присутствии 3% NaCl. Не нуждаются в дополнительных органических факторах роста. Не восстанавливают нитрат до нитритов, синтезируют аргининдегидролазу. Не гидролизуют желатин, крахмал и лецитин. Не способны к образованию левана из сахарозы и липолизу Твин-80. Оба штамма утилизируют с образованием кислоты следующие углеводы: глюкозу, ксилозу, арабинозу, галактозу. Используют широкий диапазон субстратов: сахарозу, мальтозу, фруктозу, глицерин, этанол, пропанол, бутанол, гексанол, пропионовую, янтарную, α-кетоглутаровую кислоты, ацетат, пируват, лактат, цитрат, DL-лейцин, L-аргинин, DL-α-аланин, DL-валин, L-пролин, DL-лизин, L-тирозин, L-аспарагин, фенилаланин. Способны к росту на безазотистой среде Эшби.

Кроме того, штамм АНТ 56 образует кислоты из раффинозы, лактозы, рамнозы. Использует изомасляную кислоту, не использует маннит, сорбит, L-инозит, малеиновую, адипиновую и антраниловаую кислоты, оксалат, DL-треонин, DL-серин, DL-метионин, DL-цистеин, DL-триптофан, D-аспарагин, тетрадекан, октадекан, ацетамид, формальдегид, фенол. Продуцирует экзополисахарид при росте в жидкой культуре на картофельно-глюкозной среде и среде Федорова с мелассой в качестве источника углерода.

При нанесении живых клеток исследуемых штаммов бактерий на срезы картофеля не наблю-

далось разрушения растительных клеток, что свидетельствует об отсутствии фитопатогенной активности у данных штаммов.

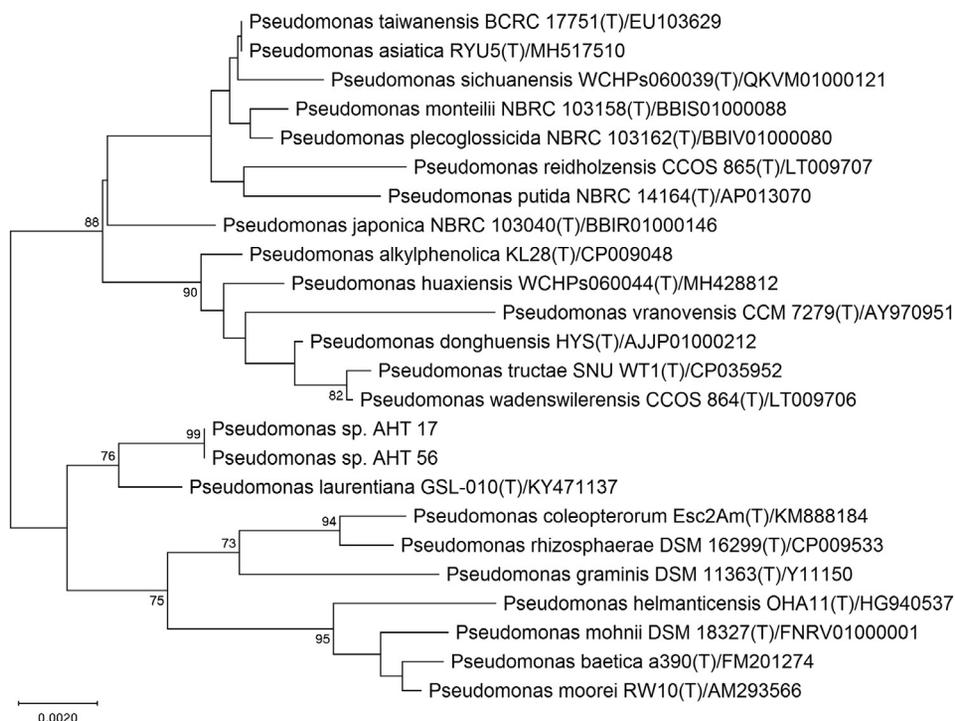
По совокупности культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штаммы АНТ 17 и АНТ 56 были предварительно идентифицированы как принадлежащие к роду *Pseudomonas* и депонированы в Коллекцию микроорганизмов Уфимского Института биологии УФИЦ РАН под номерами ИВ-В 5-17 и ИВ-В 5-56 соответственно.

Для изучаемых микроорганизмов было проведено секвенирование гена, кодирующего 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности штаммов АНТ 17 (1402 п.н.) и АНТ 56 (1344 п.н.) депонированы в GenBank (MN541118 и MN541119 соответственно).

В результате их сравнительного анализа установлено, что максимальное сходство штамма АНТ 17 наблюдалось с типовыми штаммами *P. laurentiana* GSL-010<sup>T</sup> (99,29%), *P. japonica* NBRC 103040<sup>T</sup> (98,79%) и *P. huaxiensis* WCHPs060044<sup>T</sup> (98,79%).

Степень гомологии между нуклеотидными последовательностями гена 16S рРНК штамма АНТ 56 и штаммов *P. laurentiana* GSL-010<sup>T</sup>, *P. rhizosphaerae* DSM16299<sup>T</sup>, *P. japonica* NBRC 103040<sup>T</sup> была равна 99,63, 99,18 и 99,11% соответственно.

С целью уточнения филогенетического положения было построено древо на основе сравнительных данных о последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК видов, относящихся к роду *Pseudomonas* (рисунок). На дендрограмме видно,



**Рисунок.** Филогенетическое положение штаммов *Pseudomonas* sp. АНТ 17 и *Pseudomonas* sp. АНТ 56, основанное на анализе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее двум нуклеотидным заменам на каждые 1000 нуклеотидов. Числами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа (приведены значения «bootstrap»-анализа выше 70%).

что изучаемые микроорганизмы образуют общий кластер, при этом филогенетически наиболее близким к ним штаммом является типовой представитель вида *P. laurentiana* (*P. laurentiana* GSL-010<sup>T</sup>).

В качестве еще одного таксономического признака был изучен жирнокислотный состав клеточной стенки штаммов АНТ 17 и АНТ 56 (табл. 1). В ходе исследований было показано, что в профилях обоих штаммов доминирующими являлись гексадекановая (C16:0), комбинация гексадеценовой и пентадеценовой (C16:1 ω7c + C15:1 iso 2-OH), цис-11-октадеценовая (C18:1 ω7c) и гексадеценовая (C16:1) жирные кислоты. В целом жирнокислотный профиль штаммов соответствует таковому у типового штамма вида *P. laurentiana* GSL-010.

Таблица 1

Содержание жирных кислот в клетках штаммов *Pseudomonas* sp. АНТ 17, *Pseudomonas* sp. АНТ 56 и *P. laurentiana* GSL-010<sup>T</sup> [4] (% от суммарного)

Жирные кислоты	<i>Pseudomonas</i> sp. АНТ 17	<i>Pseudomonas</i> sp. АНТ 56	<i>P. laurentiana</i> GSL-010 <sup>T</sup>
C10:0	0,2	—	0,1
C12:0	2,5	2,3	2,7
C14:0	1,4	1,9	1,8
C15:0	—	0,3	0,4
C16:0	37,1	33,6	32,3
C17:0	0,2	—	0,1
C18:0	0,2	0,5	0,2
C16:1	8,3	15,0	—
C18:1	1,9	0,7	—
C16:1 ω5c	—	—	0,1
C17:1 ω8c	—	—	0,1
C18:1 ω7c	11,2	10,0	8,3
C17:0 cyclo	1,0	2,8	1,1
C18:1 methyl ω7c	—	—	0,4
C10:0 3-OH	—	—	3,8
C12:0 2-OH	3,4	4,3	4,2
C12:0 3-OH	2,3	4,0	3,7
C12:1 3-OH	—	—	0,1
C16:1 ω7c + C15:1 iso 2-OH	29,2	24,6	40,4
C19:1 ω6c + C19:1 cyclo ω10c	1,1	—	0,2

Примечание: «—» — не обнаружено.

Таким образом, на основании сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и состава жирных кислот клеточной стенки, а также культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков штаммы АНТ 17 и АНТ 56 были идентифицированы как представители вида *Pseudomonas laurentiana*.

**Характеристика новых PGP-штаммов**

**Антагонистическая активность.** При изучении спектра антагонистической активности штаммов бактерий *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 было показано, что микроорганизмы подавляют развитие фитопатогенных грибов родов *Bipolaris* и *Fusarium* (табл. 2). Изучаемые штаммы бактерий проявляли избирательность в отношении данных микромицетов, диаметры зон ингибирования роста фитопатогенов значительно варьировали. При этом штаммы наиболее активно подавляли рост *B. sorokiniana* ИБ Г-12 и *F. semitectum* ВКМ 1938. Показатели антагонистической активности исследуемых штаммов сопоставимы с таковыми известных штаммов-антагонистов рода *Pseudomonas* [16, 17].

Таблица 2

Спектр антагонистической активности штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56

Виды фитопатогенных грибов	Диаметр зоны ингибирования роста гриба, мм	
	<i>P. laurentiana</i> АНТ 17	<i>P. laurentiana</i> АНТ 56
<i>Fusarium avenaceum</i> ВКМ 132	7,0±1,1	7,0±0,9
<i>F. culmorum</i> ВКМ 844	12,0±1,6	17,0±1,9
<i>F.gibbosum</i> ВКМ 848	11,0±1,5	10,0±1,3
<i>F. nivale</i> ВКМ 3106	10,0±1,0	8,0±1,2
<i>F. oxysporum</i> ВКМ 137	10,0±1,4	6,0±0,8
<i>F.semitectum</i> ВКМ 1938	26,0±3,0	21,0±2,5
<i>F. solani</i> ВКМ 142	10,0±1,2	10,0±1,0
<i>Bipolaris sorokiniana</i> ИБ Г-12	26,0±2,8	30,0±3,3

**Природа антигрибных метаболитов.** Известно, что антагонизм микроорганизмов может быть связан с синтезом железотранспортирующих агентов-сидерофоров, конкурирующих с сидерофорами фитопатогенных микроорганизмов за необходимое для последних железо.

Было показано, что внесение железа в питательную среду не приводит к изменению антигрибной активности штаммов бактерий. Так, на среде Кинг Б с внесением FeCl<sub>3</sub> диаметр зоны подавления роста фитопатогена *B. sorokiniana* для штамма *P. laurentiana* АНТ 17 составил 26 мм, для штамма *P. laurentiana* АНТ 56 – 32 мм.

Таким образом, было установлено, что антагонистическая активность штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 не лимитируется присутствием железа в среде, т.е. и антигрибные свойства культур определяются синтезом не сидерофоров, а, вероятно, веществ антибиотической природы.

**Синтез фитогормонов** – одно из важнейших свойств бактерий, отнесенных к группе PGPR. У штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 была изучена способность к продуцированию фитогормонов – индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и цитокининоподобных веществ. Известно, что ИУК участвует в регуляции деления и роста клеток растяжением, дифференцировке корней и других процессах роста и развития растения [18, 19], в то время как цитокинины и цитокининоподобные вещества индуцируют деление клеток и участвуют в поддержании апикальной меристемы побега [20].

Значимое количество иммунореактивных веществ было обнаружено в культуральной жидко-

сти штамма *P. laurentiana* АНТ 17. Данный микроорганизм обладал способностью к синтезу ИУК в количестве 804 нг/мл культуральной жидкости и не продуцировал цитокинины. Штамм бактерий *P. laurentiana* АНТ 56 синтезировал ИУК и цитокинины в количестве 166 и 68 нг/мл культуральной жидкости соответственно. Количество ИУК, накапливаемое в культуральной жидкости исследуемыми штаммами, превышало значения данного показателя для продуцента фитогормонов *Pseudomonas koreensis* ИБ-4 (ВКМ В-2830D), описанного нами ранее [21], для которого оно составляло 40 нг/мл культуральной жидкости. Однако штамм *P. laurentiana* АНТ 56 уступал ему в продукции цитокининов.

**Фосфатмобилизирующая активность.** Способность микроорганизмов к растворению органических и неорганических соединений фосфора в почве играет важную роль в питании растений. Синтез бактериями метаболитов в виде кислот и ферментов (фосфатаз) влияет на подвижность данного органогенного элемента и последующую его доступность для растений. При изучении способности к превращению соединений фосфора у штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 на питательных средах Пиковской и Муромцева было отмечено образование четких зон просветления, что свидетельствует о наличии мобилизирующей активности данных бактерий в отношении неорганических фосфатов. Способности к расщеплению органических соединений фосфора при выращивании бактерий на среде, содержащей органический фосфор в виде аденозинтрифосфата натрия, установлено не было.

**Влияние на всхожесть растений.** Во всех вариантах опыта было отмечено положительное влияние инокуляции бактериями семян сельскохозяйственных культур на их всхожесть по сравнению с контролем, что подтверждает наличие у изучаемых штаммов РGP-свойств. При этом наиболее «отзывчивыми» на предпосевную обработку оказались семена капусты и огурца — их всхожесть на четвертые сутки увеличилась в среднем на 7% и 9% соответственно по сравнению с контролем. Бактеризация штаммами микроорганизмов ускоряла процесс прорастания семян томатов: на вторые сутки их всхожесть превышала значения контроля на 7–9%, однако к четвертым суткам различия между контроль-

ными и опытными вариантами были статистически не значимы (при  $p \leq 0,05$ ).

**Эффективность против комплекса возбудителей корневых гнилей.** Было показано, что в условиях естественной зараженности семян обработка штаммами бактерий *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 способствует снижению распространения грибов рода *Alternaria* на 38,3% и 50,6% соответственно и гельминтоспориозной корневой гнили, вызываемой *B. sorokiniana*, на 71,4% и 87,3% (табл. 3).

Используемый в качестве эталона биопрепарат «Ризоплан» демонстрировал высокую степень биологической эффективности по отношению к вызывающему корневые гнили пшеницы микромицету *B. sorokiniana* (71,4%), но оказался малоэффективным против альтернариоза проростков. Это свидетельствует о том, что в случае естественного инфекционного фона показатели эффективности воздействия на фитопатогены у исследуемых штаммов были не ниже, чем у известных биологических препаратов.

При обработке биопрепаратом «Ризоплан» и жидкой культурой штамма *P. laurentiana* АНТ 17 количество непроросших семян было меньше, чем в контроле (табл. 3). При этом в варианте со штаммом *P. laurentiana* АНТ 56 достоверных различий с контролем по данному параметру не было выявлено.

Показатель, характеризующий долю ненормально развивающихся проростков при обработке бактериями, в том числе биопрепаратом «Ризоплан», был в 2–3 раза меньше, чем в контроле. Это свидетельствует о снижении поражения тканей растений пшеницы фитопатогенными микромицетами вследствие воздействия антигрибных метаболитов РGP-бактерий.

Таким образом, на основании анализа физиолого-биохимических свойств, нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и состава жирных кислот клеточной стенки была установлена принадлежность штаммов бактерий АНТ 17 и АНТ 56 к виду *Pseudomonas laurentiana*.

Было показано, что штаммы *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 обладают целым рядом полезных для роста и развития растений свойств, характерных для РGP-микроорганизмов. В частности, они проявляют антигрибную активность в отношении большого количества фитопатогенов.

Таблица 3

Эффективность применения штаммов *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 против семенной инфекции пшеницы

Вариант	Непроросшие семена, %	Ненормально развившиеся проростки, %	Количество проростков пшеницы, пораженных болезнями, %	
			<i>B. sorokiniana</i>	<i>Alternaria</i> sp.
Контроль	11,0±0,7*	18,0±0,9*	48,6±1,2*	12,6±0,8*
Биопрепарат «Ризоплан»	8,0±0,6*	8,6±1,2*	44,6±1,6*	3,6±0,2*
<i>P. laurentiana</i> АНТ 17	10,0±0,2*	6,6±0,5*	30,0±1,5*	2,0±0,1*
<i>P. laurentiana</i> АНТ 56	10,6±0,3	8,0±0,7*	24,0±1,1*	1,6±0,07*

Примечание: \* — различия с контролем статистически значимы при  $p \leq 0,05$ .

тогенных микромицетов, способны к разложению неорганических фосфатов и синтезу фитогормональных веществ. Протравливание семян огурца, томата и капусты жидкой культурой с титром  $\sim 10^5$  КОЕ/мл оказывало благоприятное воздействие на всхожесть растений. Предпосевная обработка семян пшеницы в условиях естественного инфекционного фона инокулятом выделенных штаммов бактерий способствовала снижению распространения грибов, вызывающих корневые гнили. По совокупности полезных свойств штаммы *P. laurentiana* АНТ 17 и *P. laurentiana* АНТ 56 можно признать перспективными для дальнейше-

го изучения с точки зрения применения в биотехнологии с целью повышения продуктивности агроэкосистем.

Исследование выполнено с использованием оборудования Регионального центра коллективного пользования «Агидель» в рамках госзадания УФИЦ РАН (№ 075-00326-19-00) по теме № АААА-А18-118022190100-9 на базе Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Работа осуществлена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dignam B.E., O'Callaghan M., Condon L.M., Raaijmakers J.M., Kowalchuk G.A., Wakelin S.A. Impacts of long-term plant residue management on soil organic matter quality, *Pseudomonas* community structure and disease suppressiveness // *Soil Biol. Biochem.* 2019. Vol. 135. P. 396–406.
2. Singh D., Ghosh P., Kumar J., Kumar A. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs): functions and benefits // *Microbial interventions in agriculture and environment* / Eds. D. Singh, G. Gupta, and R. Prabha. Singapore: Springer Nature, 2019. P. 205–227.
3. Fischer S., Principe A., Alvarez F. Fighting plant diseases through the application of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains // *Symbiotic endophytes: soil biology*, vol. 37 / Ed. R. Aroca. Berlin: Springer Verlag, 2013. P. 165–193.
4. Wright M.H., Hanna J.G., Pica D.A., Tebo B.M. *Pseudomonas laurentiana* sp. nov., an Mn(III)-oxidizing bacterium isolated from the St. Lawrence Estuary // *Phycog. Commn.* 2018. Vol. 8. N 4. P. 153–157.
5. Deshmukh A.M. Handbook of media, stains and reagents in microbiology. New Delhi: PAMA Publication, 1997. 240 pp.
6. Gerhardt P. Manual of methods for general bacteriology. Washington: American Society of Microbiology, 1981. 524 pp.
7. Bergey's Manual of systematic bacteriology. The *Proteobacteria*, part B, the *Gammaproteobacteria* / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, and J.T. Staley. N.Y.: Springer, 2004. P. 323–379.
8. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 1991. P. 115–177.
9. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chan J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017. Vol. 67. N 5. P. 1613–1617.
10. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35. N 6. P. 1547–1549.
11. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol. 4. N 4. P. 406–425.
12. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. Vol. 16. N 2. P. 111–120.
13. Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical Note #101 // MIDI. Newark: MIDI Inc., 1990.
14. Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V., Gabbasova I.M., Melentiev A.I., Veselov S.Yu. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants // *Acta Physiol. Plant.* 2017. Vol. 39. N 11: 253.
15. Chetverikov S.P., Loginov O.N. New metabolites of *Azotobacter vinelandii* exhibiting antifungal activity // *Microbiol.* 2009. Vol. 78. N 4. P. 428–432.
16. Yang M., Mavrodi D.V., Mavrodi O.V., Bonsall R.F., Parejko J.A., Paulitz T.C., Thomashow L.S., Yang H.-T., Weller D.W., Guo J.-H. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields // *Phytopathology.* 2011. Vol. 101. N 12. P. 1481–1491.
17. Zakharchenko N.S., Kochetkov V.V., Buryanov Y.I., Boronin A.M. Effect of rhizosphere bacteria *Pseudomonas aureofaciens* on the resistance of micropropagated plants to phytopathogens // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011. Vol. 47. N 7: 661.
18. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. Vol. 31. N 4. P. 425–448.
19. Francis I., Holsters M., Vereecke D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions // *Environ. Microbiol.* 2010. Vol. 12. N 1. P. 1–12.
20. Zhao Z., Andersen S.U., Ljung K., Dolezal K., Miotk A., Schultheiss S.J., Lohmann J.U. Hormonal control of the shoot stem-cell niche // *Nature.* 2010. Vol. 465. N 7301. P. 1089–1092.
21. Rafikova G.F., Korshunova T.Yu., Minnebaev, L.F., Chetverikov, S.P., Loginov O.N. A new bacterial strain *Pseudomonas koreensis* IB-4, as a promising agent for plant pathogen biological control // *Microbiology.* 2016. Vol. 85. N 3. P. 333–341.

Поступила в редакцию 27.02.2020 г.

После доработки 17.08.2020 г.

Принята в печать 15.09.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

## New bacterial strains *Pseudomonas laurentiana* as promising agents for agrobiotechnology

G.F. Rafikova\* , E.V. Kuzina, T.Yu. Korshunova, O.N. Loginov

*Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,  
st. Prospect Oktyabrya 69, lit. E, Ufa, 450054, Russia  
\*e-mail: rgf07@mail.ru*

Bacterial strains ANT 17 and ANT 56 were isolated from activated sludge, antagonistic to plant pathogenic fungi *Bipolaris sorokiniana*. Physiological, biochemical, and culture morphological properties, analysis of the 16S rRNA gene sequence and composition of fatty acids of cell walls of strains AHT 17 and AHT 56 supported its classification within the species *Pseudomonas laurentiana*. It was shown that strains *P. laurentiana* AHT 17 and *P. laurentiana* AHT 56 possess a set of properties characteristic of PGP microorganisms: they exhibit antifungal activity against phytopathogenic micromycetes, are capable of decomposing phosphates and synthesizing phytohormonal substances. Inoculation of cucumber, tomato and cabbage seeds had a beneficial effect on their germination. Pre-sowing treatment of wheat seeds under the conditions of a natural infectious background with an inoculum of isolated bacterial strains contributed to a decrease in the spread of fungi that cause root rot. The possibility of using strains *P. laurentiana* and *P. laurentiana* AHT 56 in biotechnology in order to increase the productivity of agroecosystems. The ability to stimulate the growth and development of plants for strains of the *P. laurentiana* species was shown for the first time.

**Keywords:** *Pseudomonas laurentiana*, PGP-microorganisms, 16S rRNA gene, antifungal activity, indolylacetic acid, cytokinins

### Сведения об авторах

Рафикова Гульназ Фаилевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: rgf07@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7655-5588>

Кузина Елена Витальевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: misshalen@mail.ru

Коршунова Татьяна Юрьевна – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: korshunovaty@mail.ru

Логинов Олег Николаевич – докт. биол. наук, глав. науч. сотр. лаборатории биотехнологий Уфимского Института биологии УФИЦ РАН. Тел: 8-347-235-57-04; e-mail: biolab316@yandex.ru