

ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ИЗ ДИКОРАСТУЩИХ РАСТЕНИЙ  
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

Б. Р. Исламов, Е. Ю. Шульга

**Реферат.** Исследования проводили с целью создания новых консорциумов из микроорганизмов, полученных из дикорастущих видов растений (зверобой, душица, подорожник и камыш) и проверки способности их поддержания в почве и ризосфере. У выделенных 216 бактериальных изолятов определяли свойства, имеющие значение для защиты и стимуляции роста растений, как в лабораторных, так и в полевых условиях, а именно ферментативную активность, в том числе фитазную, протеазную, липазную, нитрогеназную, целлюлазную и амилазную. Кроме того, была проверена антагонистическая активность изолятов к фитопатогенному грибу *Fusarium oxysporum*. Затем изоляты идентифицировали путем сравнения последовательностей гена 16S рРНК. После чего отсеивали патогенные бактерии и на основании проявляемых ферментативных активностей отбирали наиболее перспективные бактериальные изоляты, из которых собирали консорциум для проверки возможности его поддержания в почве и ризосфере растений пшеницы сорта Универсиада. Для этого семена обрабатывали консорциумом в дозе  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл в 1%-ном растворе карбоксиметилцеллюлозы и через 14 суток делали смывы почвы и корней контрольных и испытуемых растений. Наличие или отсутствие исследуемых штаммов определяли методом ПЦР-фингерпринтинга. Консорциум микроорганизмов лучше сохранялся в почве, чем на корнях растений. Его использование увеличивало длину побегов подопытных растений, относительно контрольных, на 38,6% (с 10,6 см до 14,7 см), длину корневой системы – на 22,1% (с 12,2 см до 14,9 см) и всхожесть семян – на 3,0% (с 87% до 90%). Полученные данные могут быть использованы для дальнейших экспериментов и практического применения в сельском хозяйстве.

**Ключевые слова:** консорциум микроорганизмов, ферментативные активности, дикорастущие растения, стимуляция роста, антагонизм.

**Введение.** В современных условиях сельского хозяйства происходит увеличение использования различных микроорганизмов в качестве основы биологических удобрений и средств биологической защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов [1, 2, 3]. Кроме того, такие биопрепараты стимулируют рост культурных растений и обеспечивают увеличение стрессоустойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам [4]. Новыми источниками для формирования биопрепаратов могут послужить микроорганизмы (эндофиты, эпифиты), полученные из дикорастущих растений [5]. Бактерии, обитающие в неокультуренных (диких) растениях (эндофиты и эпифиты), играют важную роль в их экосистеме. Некоторые из них способны фиксации азота [6]. Кроме того, из-за сильной конкуренции в дикой среде, эндофитные бактерии растений могут противостоять фитопатогенным грибам и бактериям [7, 8]. Благодаря сложившимся микробиоценозам, дикорастущие виды меньше подвержены болезням. В то же время, наряду с полезными бактериями в диких растениях существуют и фитопатогенные микроорганизмы, вызывающие такие заболевания, как мокрые гнили, ожоги, пятнистости и др. [9]. В целом, бактерии, диких растений, как эндофитные, так и эпифитные, играют важную роль в поддержании экологического баланса, который сложился благодаря многовековой естественной селекции, и могут быть использованы в таких областях, как очистка сточных вод, биоремедиация и сельское хозяйство.

Таким образом, бактерии, ассоциированные с дикорастущими растениями, представляют

большой интерес для понимания микробно-растительных взаимодействий и практического применения в сельском хозяйстве.

Цель исследования – создать новые консорциумы из микроорганизмов, полученных из дикорастущих видов растений и проверить возможность их поддержания в почве и ризосфере.

**Условия, материалы и методы.** В качестве новых источников бактериальных изолятов были использованы растения зверобой (*Hypericum perforatum*), душицы (*Origanum vulgare*), подорожника (*Plantago major*) и камыша (*Scirpus sylvaticus*). Образцы почв и растений, использованные для эксперимента, были отобраны в период с марта по июнь 2023 года садово-дачное товарищество Волга, Казань, Республика Татарстан 55.822079 широты, 48.839731 долготы. Каждая проба была отобрана в трех повторностях.

Все образцы почвы и дикорастущих растений (корни и надземные части), собирали в стерильные пробирки на 50 мл и доставляли в лабораторию. Бактериальные изоляты получали из проб растений и почвы методом смыва (к испытуемому образцу приливали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) в соотношении 1:9, перемешивали с помощью вортекса в течение 1 минуты). Полученные смывы через серию разведений поверхностно высевали на неселективную среду King B (пептон – 10 г/л, глицерин – 10 г/л, агар микробиологический – 18 г/л, сульфат магния – 12,5 мМ, фосфат калия двузамещенный – 8,6 мМ) с антигрибковым препаратом нистатином в концентрации 32 мкг/мл. Засеянные чашки Петри инкубировали при температуре +30°C в течение суток.

Затем из чашек с бактериями отбирали все отдельные колонии для понимания видового соотношения микробиома исследуемого образца. После получения необходимой биомассы бактерий, бактериальные колонии ресуспендировали в ФСБ, добавляли глицерин в соотношении 0,7:0,3=образец:глицерин и убирали на криохранилище. Далее определяли ферментативные активности полученных изолятов.

Для определения протеолитической активности, бактериальные штаммы высевали на чашку Петри с базовой средой (ВМ) с добавлением молочного белка казеина, содержащей на 1 л: 5,8 г фосфата калия двузамещенного, 3 г фосфата калия однозамещенного, 1 г сульфата аммония, 1,5 г сульфата магния семиводного, 10 г сухого обезжиренного молока, 15 г агара и культивировали в суховоздушном термостате ТС-1/20 СПУ (Амедис Инжиниринг, РФ). Вокруг колоний бактериальных изолятов, обладающих протеолитической активностью, наблюдали зоны просветления, образуемые в результате гидролиза казеина в среде [10].

При определении фитазной активности, штаммы высевали на чашку Петри со средой PSM (phytase screening medium), содержащий на 1 л 20 г глюкозы; 5 г фитата натрия; 5 г нитрата аммония; 0,5 г сульфата магния семиводного; 0,5 г хлорида калия; 0,01 г сульфата железа семиводного; 1 г сульфата марганца четырехводного; 18 г бактериологического агара (размер частиц, сито 60, % не менее 95); 2 г хлорида кальция; pH 7. Штаммы культивировали в суховоздушном термостате ТС-1/20 СПУ (Амедис Инжиниринг, РФ). Штаммы, проявляющие активность, образовывали зону просветления вокруг колоний [11].

Для определения целлюлолитической активности, штаммы высаживали на модифицированную среду ВМ, содержащий на 1 л 5,8 г фосфата калия двузамещенного; 3 г фосфата калия однозамещенного, 1 г сульфата аммония; 1,5 г сульфата магния семиводного; 1 г триптона; 10 г карбоксиметилцеллюлозы; 18 г агара. Штаммы культивировали в суховоздушном термостате ТС-1/20 СПУ (Амедис Инжиниринг, РФ). Целлюлолитическую активность идентифицировали методом детекции зон просветления (желтого цвета) вокруг колонии после окрашивания конго красным, образующихся в связи с разрушением целлюлозы и, тем самым ее комплексов с красителем [12].

Для определения амилазной активности использовали среду следующего состава на 1 л дистиллированной воды: 0,5 г пептона; 0,1 г хлорида калия; 0,5 г сульфата магния семиводного; 0,1 г сульфата аммония; 20 г крахмала; 16 г агара. Штаммы культивировали в суховоздушном термостате ТС-1/20 СПУ (Амедис Инжиниринг, РФ). Гидролиз крахмала в среде детектировали по образованию зон просветления при окраске среды раствором Люголя [13].

Для определения наличия внеклеточных липаз полученные штаммы высевали на среду с добавлением Tween 80, содержащий

на 1 л 10 г пептона; 5 г хлорида натрия; 1 г хлорида кальция двуводного; 20 г агара; 10 г Tween 80. Штаммы культивировали в суховоздушном термостате ТС-1/20 СПУ (Амедис Инжиниринг, РФ). Наличие у бактерий внеклеточной липазной активности детектировали по наличию вокруг колоний непрозрачной зоны кальциевых солей жирных кислот, освобожденных из Tween 80 [14].

Для идентификации изолятов бактерий, способных к фиксации азота в аэробных условиях, штаммы высевали в чашки Петри на среду Йенсена (сахароза – 20 г/л, фосфат калия двузамещенный – 1 г/л, сульфат магния – 0,5 г/л, хлорид натрия – 0,5 г/л, сульфат железа – 0,1 г/л, молибдат натрия – 0,005 г/л, карбонат кальция – 2 г/л, агар – 15 г/л) и инкубировали в течение 2-5 суток при 30°C [15].

Изоляты, полученные из дикорастущих растений, идентификации на основании сравнения последовательностей гена 16S рРНК. Для этого геномную ДНК бактерий выделяли стандартным методом. Далее проводили амплификацию фрагмента гена 16S рРНК с использованием стандартных праймеров 27F (5'-gagtttgatcctggctcag-3') и 1492R (5'-tacctgttacgactt-3'). Полученные ПЦР продукты очищали из агарозного геля с использованием коммерческого набора Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) и проводили секвенирование по Сэнгеру (секвенирование проводили в компании «Евроген») [16].

Антагонистическую активность выделенных штаммов определяли против фитопатогенного гриба *F. oxysporum*. В чашку Петри со средой PDA (картофельный бульон – 1 л, декстроза – 20 г/л, агар – 20 г/л) в равноудаленном расстоянии друг от друга вносили 3 мкл суспензии штаммов бактерий и 2 мкл суспензии фитопатогенного гриба в шахматном порядке и выдерживали в течение 5 суток при температуре 30°C. Антагонистическую активность оценивали по зонам подавления роста фитопатогена [17].

Выбранные штаммы оценивали на биосовместимость с использованием анализа с поперечными полосами на питательных агаровых средах King B (KB), Лурия-Бертани (LB; триптон – 10 г/л, хлорид натрия – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 10 г/л, агар микробиологический – 18 г/л, сульфат магния – 12,5 мМ, pH= 7,5) и PDA, линиями перпендикулярно друг другу, чашки Петри инкубировали при 30°C в течении 48 ч. О совместимости штаммов оценивали по отсутствию зоны подавления роста в местах пересечения линий посевов [18].

Для поддержания консорциума в почве и ризосфере каждый штамм выращивали отдельно в питательной среде LB при 30°C в течении суток в шейкере-инкубаторе ZQZY-78A (Shanghai Zhichu Instrument Co., Ltd., Китай). Далее культуру доводили до  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл 1% раствором карбоксиметилцеллюлозы и смешивали в равных пропорциях. Семена пшеницы инкубировали в смеси бактерий

в течение 15 минут, высушивали при комнатной температуре в течение 20 минут и сажали в грунт. После 14 суток роста растений пшеницы, делали смывы почвы и корней контрольных (семена растений, необработанные бактериальными консорциумами) и испытуемых (семена растений, обработанные бактериальными консорциумами) растений. Смывы высевали на чашку Петри со средой КБ с содержанием нистатина 50 мкг/мл. Далее для каждого образца (корней и почвы контрольных и опытных растений). Далее подготавливали смывы физраствором (0,5% раствор хлорида натрия) с корней растений и почвы как контрольных, так и опытных образцов. Через серию разведений смывы высаживали на чашку Петри с питательной средой Кинг Б (КБ) и получали по 36 случайных изолятов из образцов корней и почвы контрольных и испытуемых растений. Колонии высаживались на чашку Петри с КВ для дальнейшего на наличие и/или отсутствие искомым штаммов. Для проведения ПЦР-типирования выделенных изолятов использовали праймеры к BOX (BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') и праймеры к неинвертированным участкам последовательности ERIC анализа методом ПЦР-фингерпринтинга (ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCAC-3', ERIC2 5'-AAGTAAGTACTGGGGGTGACG-3'). Программу проведения BOX-ПЦР и ERIC-ПЦР типирования: 95 °C – 3 мин, (95 °C – 20 сек, 53 °C – 1 мин, 65 °C – 8 мин, 34 цикла), 65 °C – 18 мин, хранение – при 12 °C.

Далее проводили электрофоретический анализ полученных продуктов амплификации в агарозном геле и биоинформационную обработку полученных графических данных с помощью программы BioNumerix (Франция). В качестве маркера молекулярных масс использовался DNA Ladder 1 kb (Евроген, номер по каталогу NL001) (полосы с увеличенной яркостью имеют размер 1 т.п.н. и 3 т.п.н.). Кроме того, снимали биометрические показатели растений (сухая масса, длина корней и побегов) и подсчитывали количество растений. Эксперименты проводили в 10 биологических и 3 аналитических повторностях.

Статистический анализ проводили с использованием пакета статистических программ OriginLab pro SR1 b9.5.1.195. Достоверная разница между группами проанализирована

с использованием одностороннего ANOVA и апостериорного теста Тьюки на достоверно значимую разницу при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Из листьев, почвы и ризосферы дикорастущих растений получено 216 изолятов. Была проведена идентификация на основании сравнения последовательностей гена 16S рРНК. В идентифицированных образцах доминировали штаммы, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, а также встречались бактерии относящиеся к родам *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Leifsonia*, *Luteimonas* и *Enterobacter*. Из 216 полученных изолятов 32,3% проявили амилазную активность; 41,7% липазную активность; 50% изолятов нитрогеназную активность; 37,6% протеазную активность; 45,8% фитазную активность и 32,9% изолятов продемонстрировали целлюлазную активность. 30% из полученных изолятов являлись фитопатогенами. Среди них встречались микроорганизмы, относящиеся к роду *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Pectobacterium*. Из непатогенных штаммов только 31,5% проявили антагонизм в фитопатогенному грибу *F. oxysporum*.

После получения всех данных (ферментативная активность, антагонистическая активность) и исключения патогенных бактерий согласно классификации немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур Лейбницкого института (<https://www.bacdiv.dsmz.de/>), был сформирован консорциум из непатогенных и перспективных штаммов, включающая в себя штаммы КМ 24, АНМ79, АНМ 107 и АНМ 109. Штаммы консорциума КМ 24, АНМ79 и АНМ 109 благодаря фитазной и нитрогеназной активности усиливают минеральное питание растений благодаря мобилизации труднодоступных форм фосфора почв и минерализации атмосферного азота. Внеклеточные протеазы, выделяемые штаммами КМ 24 и АНМ79, могут служить одним из фактором антагонистической активности бактерий, позволяя им конкурировать с другими микроорганизмами, в частности фитопатогенами. Наличие амилазной (штамм АНМ 107), липазной (штаммы КМ 24, АНМ 107 и АНМ 109) и целлюлазной активности (штамм АНМ 107) у бактерий способствует разложению растительных остатков в почве и тем самым обогащают её (табл. 1).

Таблица 1 – Ферментативная бактерий, входящих в консорциум, и антагонизм к фитопатогенному грибу *F. oxysporum*

Штамм (источник штамма)	Название бактерий по идентичности на базе данных NCBI	Ферментативная активность						Антагонизм к <i>F. oxysporum</i>
		фитазная	протеазная	липазная	нитрогеназная	целлюлазная	амилазная	
АНМ 79 (ризосфера подорожника)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	+	+	-	-	-	-	-
АНМ 107 (ризосфера полыни)	<i>Pseudomonas synxantha</i>	-	-	+	-	-	+	+
АНМ 109 (ризосфера полыни)	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	-	-	+	+	-	-	+
КМ 24 (филоплан камыша)	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+	+	+	+	-	+

Штаммы КМ 24, АНМ 107 и грибу *F. oxysporum*, так как отмечали зоны подавления роста АНМ 109 показали антагонистическую активность к фиопатогенному фитопатогена (рис. 1).



Рис. 1 – Проверка отобранных штаммов на антагонизм к фитопатогенному грибу *F. oxysporum*

Штаммы, отобранные по совокупности ферментативных активностей и антагонизму проверяли на биосовместимость. По результатам теста внутри консорциума не было обнаружено конкурентных

взаимодействий и подавления роста между штаммами на всех использованных питательных средах — отсутствовали зоны лизиса, не происходила остановка роста культур (рис. 2).

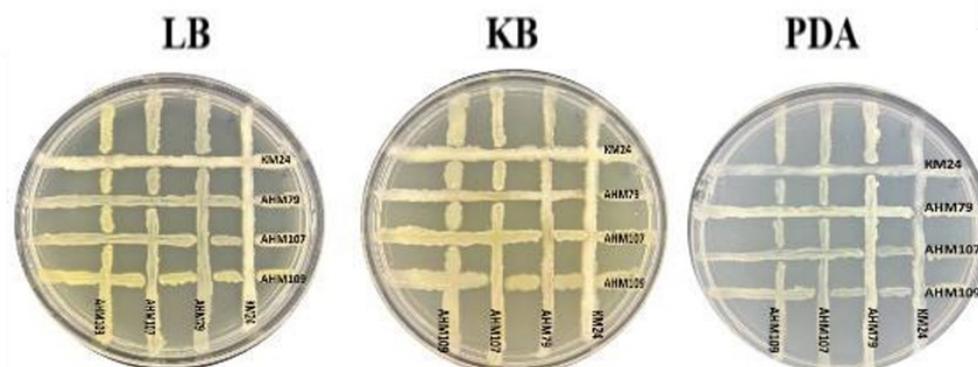


Рис. 2 – Совместимость бактериальных штаммов консорциумов на разных питательных средах (LB, KB, PDA)

В результате проверки поддержания консорциума в почве и ризосфере растений проводили сравнение профилей изолятов с помощью метода ПЦР-фингерпринтинга. Ни один из внесенных штаммов не обнаруживали в контрольном образце (рис. 3 А, В). В образцах почвы и корней пшеницы, обработанной консорциумом штаммов (опытные образцы), встречались изоляты с профилями ПЦР-фингерпринтинга совпадающими с таковыми у внесенных штаммов. Так, в опытных образцах, полученных из смыва корней растений, были обнаружены совпадения между штаммом АНМ109, который использовали в консорциуме, и 6 изолятами (под номерами 9, 13, 23, 27, 28, 34) из 36 изолятов, полученных из корней растений пшеницы, обработанных исследуемым консорциумом (рис. 3 Б).

Также было обнаружено совпадение между штаммом АНМ107, который использовали в консорциуме, и изолятом под

номером 33 (рис. 3 Б). Это свидетельствует о том, что после 14 суток роста растений пшеницы, семена которых обработаны консорциумом, только штаммы АНМ 107 и АНМ 109 сохраняются в корнях испытуемых растений. В опытных образцах, полученных из смыва почвы, были обнаружены совпадения между штаммом АНМ109 и 7 выделенными изолятами (под номерами 14, 15, 18, 22, 26, 28, 33) из 36 изолятов, полученных из смыва почвы в которой выращивали обработанные консорциумом исследуемые растения (рис. 3 Г).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после 14 суток роста пшеницы, семена которой были обработаны созданным консорциумом штаммов бактерий, штаммы АНМ 79, АНМ 107 и АНМ 109 в большем количестве присутствуют в почве, при этом только штаммы АНМ 107 и АНМ 109 обнаруживались на корнях растений.

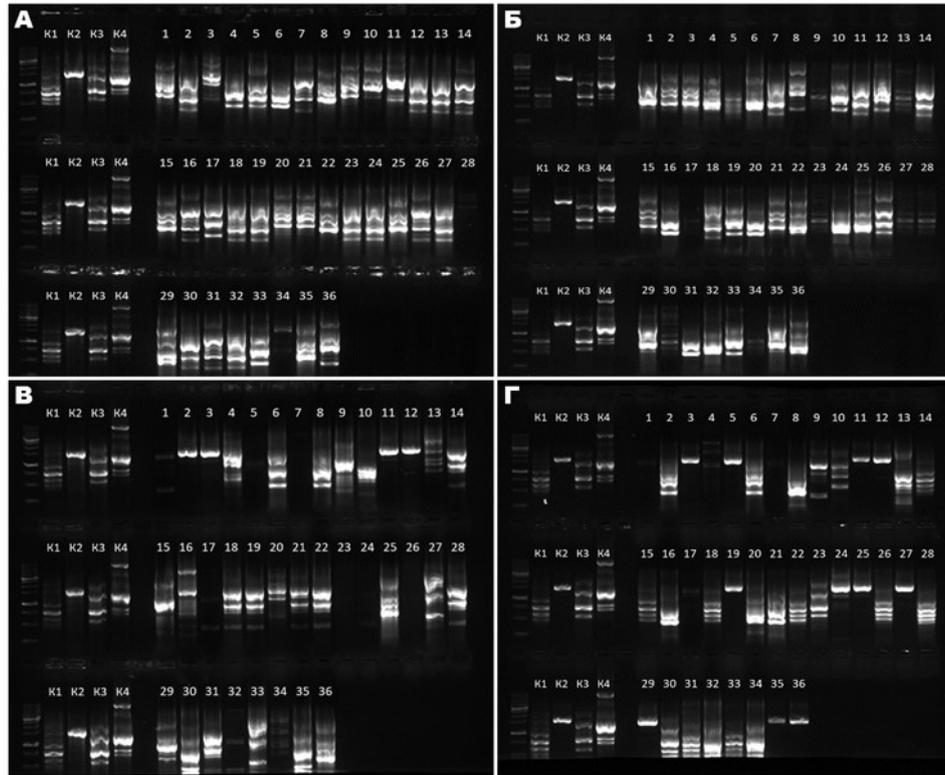


Рис. 3 – Электрофореграмма ПЦР-фингерпринтинга изолятов, выделенных из смыва: А – корни контрольных растений, Б – корни опытных растений, В – почвы контрольных растений, Г – почвы опытных растений: К1 – АНМ109, К2 – АНМ79, К3 – АНМ107, К4 – КМ24, 1...36 – выделенные штаммы. В качестве маркера молекулярных масс использовалась маркер длин ДНК DNA Ladder 1 kb

Биометрические показатели растений озимой пшеницы, обработанные консорциумом микроорганизмов, были выше, чем у контрольных растений. Длина побегов опытных растений превышала контрольные образцы на

38,6% (от 10,6 см в контроле до 14,7 см в опыте), длина корневой системы – на 22,1% (от 12,2 см в контроле до 14,9 см в опыте) и всхожести семян на 3,0% (от 87% в контроле до 90% в образце) (табл. 2).

Таблица 2 – Данные ростостимулирующих свойств на растений пшеницы созданного консорциума микроорганизмов

Признак	Контроль	Опыт
Всхожесть, %	87±0,45*	90 ± 0,53*
Масса побегов, г	0,103±0,013*	0,11±0,013*
Масса корней, г	0,02±0,004*	0,04±0,01*
Длина побега, см	10,6±1,07*	14,7±1,3*
Длина корней, см	12,2±1,2*	14,9±1,0*

\* – достоверно отличается от контроля на уровне значимости  $p \leq 0,05$

**Выводы.** Таким образом, с использованием бактерий из диких растений камыша, подорожника и полыни сформирован консорциум микроорганизмов, включающие в себя *Bacillus pumilus* (КМ24), *Bacillus altitudinis* (АНМ79), *Pseudomonas synxantha* (АНМ107), *Arthrobacter nicotinovorans* (АНМ109).

Фитазная и протеазная активность выявлена у штамма АНМ 79, выделенного из ризосферы подорожника, и КМ 24 из филоплана камыша. Липазной активностью обладали три штамма из четырех – АНМ 107 и АНМ 109, выделенных из ризосферы полыни, и КМ 24 из филоплана камыша. Нитрогеназная активность была характерная для изолятов АНМ

109 и КМ 24. Целлюлазную активность определили только у штамма КМ 24, как и амилазную – у АНМ 107. У всех штаммов, составляющих консорциум, кроме АНМ 79, выявлен антагонизм к *F. oxysporum*.

В контрольных образцах (семена растений, необработанные бактериальными консорциумами) почвы и корней пшеницы изучаемые штаммы из диких растений не обнаружены. Консорциум после обработки лучше сохраняется в почве, чем в корнях испытуемых растений.

Обработка семян пшеницы созданным консорциумом способствовала увеличению длины побегов опытных растений, относительно

контрольных, на 38,6% (с 10,6 см до 14,7 см), длины корневой системы – на 22,1% (с 12,2 см до 14,9 см) и всхожести семян – на 3,0% (с 87% до 90%).

Таким образом, микроорганизмы, ассоциированные с дикорастущими растениями благодаря способности бактерий к мобилизации основных неорганических элементов (азота и

фосфора), разложению сложных органических соединений (целлюлозы, крахмала, липидов) и биоконтролю фитопатогенных бактерий, можно использовать при создании биопрепаратов для фитостимуляции культурных растений.

**Сведение об источнике финансирования.** Работа выполнена в рамках Государственного задания номер №124050300050-4.

#### Литература

1. Role of organic farming for achieving sustainability in agriculture / A. Gamage, R. Gangahagedara, J. Gamage, et al. // *Farming System*. 2023. Vol. 1. No. 1. Article 100005. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2949911923000059?via%3Dihub> (дата обращения: 1.10.2024). doi:10.1016/j.farsys.2023.100005.
2. Organic farming in India: a vision towards a healthy nation / S. Das, A. Chatterjee, T. K. Pal // *Food Quality and Safety*. 2020. Vol. 4. No. 2. P. 69–76. Article 100005. URL: <https://academic.oup.com/fqs/article-abstract/4/2/69/5861338> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1093/fqsafe/fyaa018.
3. Эффективность лабораторного образца биопрепарата на основе *Bacillus velezensis* 336g при различных способах его применения для защиты от болезней озимых колосовых / А. М. Асатурова, Н. М. Сидоров, Н. С. Томашевич и др. // *Достижения науки и техники АПК*. 2023. Т. 37. № 5. С. 28-33.
4. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review / A. S. M. Elnahal, M. T. El-Saadony, A. M. Saad, et al. // *European Journal of Plant Pathology*. 2022. Vol. 162. No. 4. P. 759–792. doi: 10.1007/s10658-022-02472-3.
5. Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities / S. Alvarez-Perez, C.M. Herrera, C. Vega // *FEMS Microbiology Ecology*. 2012. Vol. 80. No. 3. P. 591–602. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01329.x.
6. First report on *Rahnella* sp. strain EU-A3SNfb, a plant growth promoting endophytic bacterium from wild wheat relative *Aegilops kotschy* / R. Negi, T. Kaur, R. Devi, et al. // *National Academy Science Letters*. 2022. Vol. 45. No. 5. P. 393–396. doi: 10.1007/s40009-022-01139-1.
7. Etesami H., Alikhani H. A. Evaluation of gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens // *European Journal of Plant Pathology*. 2017. Vol. 147. P. 7–14. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-016-0981-z> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01329.x.
8. Physiological response, microbial diversity characterization, and endophytic bacteria isolation of duckweed under cadmium stress / X. Yang, T. Ai-Juan, Z. Meng-Meng, et al. // *Science of The Total Environment*. 2023. Vol. 902. Article 166056. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969723046818?via%3Dihub> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166056.
9. Chathalingath N., Gunasekar A. Elucidating the physiological and molecular characteristics of bacterial blight incitant *Xanthomonas auxonopodis* pv. *punicae*; a life threatening phytopathogen of pomegranate (*Punica granatum* L.) and assessment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during host-pathogen interaction // *Microbial Pathogenesis*. 2023. Vol. 182. Article 106277. URL: <https://colab.ws/articles/10.1016%2Fj.micpath.2023.106277> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1016/j.micpath.2023.106277.
10. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil / A. K. Sharma, V. Sharma, J. Saxena, et al. // *Int J Sci Res Environ Sci*. 2015. Vol. 3. No. 9. P. 334–340. doi: 10.12983/ijres-2015-p0334-0340.
11. Singh N. K., Joshi D. K., Gupta R. K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters // *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013. Vol. 6. No. 5. Article 6419. URL: <https://brieflands.com/articles/jjm-72602> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.5812/jjm.6419.
12. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses / F. Islam, N. Roy // *BMC research notes*. 2018. Vol. 11. No. 1. P. 1–6. URL: [https://www.researchgate.net/publication/327545458\\_Screening\\_purification\\_and\\_characterization\\_of\\_cellulase\\_from\\_cellulase\\_producing\\_bacteria\\_in\\_molasses](https://www.researchgate.net/publication/327545458_Screening_purification_and_characterization_of_cellulase_from_cellulase_producing_bacteria_in_molasses) (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1186/s13104-018-3558-4.
13. Nimisha P., Moksha S., Gangawane A. K. Amylase activity of starch degrading bacteria isolated from soil // *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2019. Vol. 8. No. 4. P. 659–671. doi: 10.20546/ijcmas.2019.804.071.
14. Genetic characteristics and enzymatic activities of *Bacillus velezensis* KS04AU as a stable biocontrol agent against phytopathogens / R. G. C. Diabankana, E. U. Shulga, S. Z. Validov, et al. // *International Journal of Plant Biology*. 2022. Vol. 13. No. 3. P. 201–222. doi: 10.3390/ijpb13030018.
15. Zebua A. C., Guchi H., Sembiring M. Isolation of non-symbiotic Nitrogen-fixing bacteria on andisol land affected by Sinabung eruption // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Medan-Indonesia: IOP Publishing, 2020. Vol. 454. No.1. Article 012167. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/454/1/012167/meta> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1088/1755-1315/454/1/012167.
16. Genomic Insights into the Microbial Agent *Streptomyces albidoflavus* MGMM6 for Various Biotechnology Applications / R. G. C. Diabankana, M. Frolow, S. Keremli, et al. // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11. No. 12. Article 2872. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/12/2872> (дата обращения: 01.10.2024). doi: 10.3390/microorganisms11122872.
17. Antifungal properties, abiotic stress resistance, and biocontrol ability of *Bacillus mojavensis* PS17 / R. G. C. Diabankana, D. M. Afordoanyi, R. I. Safin, et al. // *Current Microbiology*. 2021. Vol. 78. No. 8. P. 3124–3132. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02578-7> (дата обращения: 1.10.2024). doi: 10.1007/s00284-021-02578-7.
18. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice / X. M. Xu, P. Jeffries, M. Pautasso, et al. // *Phytopathology*. 2011. Vol. 101. No. 9. P. 1024–1031. doi: 10.1094/PHYTO-08-10-0216.

## Сведения об авторах:

Исламов Бахтияр Рамилевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории Молекулярно-генетических и микробиологических методов, e-mail: b.islamov@knc.ru

Шульга Елена Юрьевна – младший научный сотрудник лаборатории Молекулярно-генетических и микробиологических методов, e-mail: e.shulga@knc.ru

Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

## OBTAINING PROMISING STRAINS FROM WILD PLANTS FOR AGRICULTURAL USE

B. R. Islamov, E. Yu. Shulga

**Abstract.** The studies were conducted to create new consortia of microorganisms obtained from wild plant species (hypericum, oregano, plantain and reed) and to test their ability to be maintained in the soil and rhizosphere. The properties of 216 bacterial isolates that are important for protecting and stimulating plant growth, both in laboratory and field conditions, were determined, namely, enzymatic activity, including phytase, protease, lipase, nitro-genase, cellulase and amylase. In addition, the antagonistic activity of the isolates to the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* was tested. Then isolates were identified by comparing the 16S rRNA gene sequences. Pathogenic bacteria were then screened out and the most promising bacterial isolates were selected based on their enzymatic activities, from which a consortium was assembled to test the possibility of its maintenance in the soil and rhizosphere of Universiade wheat plants. For this purpose, the seeds were treated with the consortium at a dose of  $\times 10^7$  CFU/ml in a 1% carboxymethylcellulose solution and the soil and roots of the control and test plants were washed after 14 days. The presence or absence of the strains under study was determined by polymerase chain reaction fingerprinting. The consortium of microorganisms was better preserved in the soil than on the roots of plants. Its use increased the shoot length of experimental plants, relative to the control, by 38.6% (from 10.6 cm to 14.7 cm), the length of the root system by 22.1% (from 12.2 cm to 14.9 cm) and seed germination by 3.0% (from 87% to 90%). The obtained data can be used for further experiments and practical application in agriculture.

**Key words:** consortium of microorganisms, enzymatic activities, wild plants, growth stimulation, antagonism.

## References

1. Gamage A, Gangahagedara R, Gamage J. Role of organic farming for achieving sustainability in agriculture. [Internet]. Farming System. 2023; Vol.1. 1. Article 100005. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2949911923000059?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.farsys.2023.100005.
2. Das S, Chatterjee A, Pal TK. Organic farming in India: a vision towards a healthy nation. [Internet]. Food Quality and Safety. 2020; Vol.4. 2. 69-76 p. Article 100005. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://academic.oup.com/fqs/article-abstract/4/2/69/5861338>. doi: 10.1093/fqsafe/fyaa018.
3. Asaturova AM, Sidorov NM, Tomashevich NS. 3. [Laboratory sample efficiency of biopreparation based on *Bacillus velezensis* 336g in various ways of its application for protection against diseases of winter crops]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2023; Vol.37. 5. 28-33 p.
4. Elnahal ASM, El-Saadony MT, Saad AM. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: a review. European Journal of Plant Pathology. 2022; Vol.162. 4. 759-792 p. doi: 10.1007/s10658-022-02472-3.
5. Alvarez-Perez S, Herrera CM, Vega C. Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. FEMS Microbiology Ecology. 2012; Vol.80. 3. 591-602 p. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01329.x.
6. Negi R, Kaur T, Devi R. First report on *Rahnella* sp. strain EU-A3SNfb, a plant growth promoting endophytic bacterium from wild wheat relative *Aegilops kotschyi*. National Academy Science Letters. 2022; Vol.45. 5. 393-396 p. doi: 10.1007/s40009-022-01139-1.
7. Etesami H, Alikhani HA. Evaluation of gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens. [Internet]. European Journal of Plant Pathology. 2017; Vol.147. 7-14 p. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-016-0981-z>. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01329.x.
8. Yang X, Ai-Juan T, Meng-Meng Z. Physiological response, microbial diversity characterization, and endophytic bacteria isolation of duckweed under cadmium stress. [Internet]. Science of The Total Environment. 2023; Vol.902. Article 166056. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969723046818?via%3Dihub>. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166056.
9. Chathalingath N, Gunasekar A. Elucidating the physiological and molecular characteristics of bacterial blight incitant *Xanthomonas auxonopodis* pv. *punicae*; a life threatening phytopathogen of pomegranate (*Punica granatum* L.) and assessment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during host-pathogen interaction. [Internet]. Microbial Pathogenesis. 2023; Vol.182. Article 106277. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://colab.ws/articles/10.1016%2Fj.micpath.2023.106277>. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106277.
10. Sharma AK, Sharma V, Saxena J. Isolation and screening of extracellular protease enzyme from bacterial and fungal isolates of soil. Int J Sci Res Environ Sci. 2015; Vol.3. 9. 334-340 p. doi: 10.12983/ijres-2015-p0334-0340.
11. Singh NK, Joshi DK, Gupta RK. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters. [Internet]. Jundishapur Journal of Microbiology. 2013; Vol.6. 5. Article 6419. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://brieflands.com/articles/jjm-72602>. doi: 10.5812/jjm.6419.
12. Islam F, Roy N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. [Internet]. BMC research notes. 2018; Vol.11. 1. 1-6 p. [cited 2024, October 1]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/327545458\\_Screening\\_purification\\_and\\_characterization\\_of\\_cellulase\\_from\\_cellulase\\_producing\\_bacteria\\_in\\_molasses](https://www.researchgate.net/publication/327545458_Screening_purification_and_characterization_of_cellulase_from_cellulase_producing_bacteria_in_molasses). doi: 10.1186/s13104-018-3558-4.
13. Nimisha P, Moksha S, Gangawane AK. Amylase activity of starch degrading bacteria isolated from soil. International Journal of current microbiology and applied sciences. 2019; Vol.8. 4. 659-671 p. doi: 10.20546/ijemas.2019.804.071.

14. Diabankana RGC, Shulga EU, Validov SZ. Genetic characteristics and enzymatic activities of *Bacillus velezensis* KS04AU as a stable biocontrol agent against phytopathogens. *International Journal of Plant Biology*. 2022; Vol.13. 3. 201-222 p. doi: 10.3390/ijpb13030018.

15. Zebua AC, Guchi H, Sembiring M. Isolation of non-symbiotic Nitrogen-fixing bacteria on andisol land affected by Sinabung eruption. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Medan-Indonesia: IOP Publishing. 2020; Vol.454. 1. Article 012167. [cited 2024, October 1]. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/454/1/012167/meta>. doi: 10.1088/1755-1315/454/1/012167.

16. Diabankana RGC, Frolov M, Keremli S. Genomic Insights into the Microbial Agent *Streptomyces albidoflavus* MGMM6 for Various Biotechnology Applications. *Microorganisms*. 2023; Vol.11. 12. Article 2872. [cited 2024, October 1]. Available from <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/12/2872>. doi: 10.3390/microorganisms11122872.

17. Diabankana RGC, Afordoanyi DM, Safin RI. Antifungal properties, abiotic stress resistance, and biocontrol ability of *Bacillus mojavensis* PS17. *Current Microbiology*. 2021; Vol.78. 8. 3124-3132 p. [cited 2024, October 1]. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-021-02578-7>. doi: 10.1007/s00284-021-02578-7.

18. Xu XM, Jeffries P, Pautasso M. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*. 2011; Vol.101. 9. 1024-1031 p. doi: 10.1094/PHYTO-08-10-0216.

**Authors:**

Islamov Bakhtiyar Ramilevich – Ph.D. in Biology, researcher of Laboratory of Molecular-genetic and microbiological methods, e-mail: [b.islamov@knc.ru](mailto:b.islamov@knc.ru)

Shulga Elena Yurevna – junior researcher of Laboratory of Molecular-genetic and microbiological methods, e-mail: [e.shulga@knc.ru](mailto:e.shulga@knc.ru)

Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia.