

БЕЛКОВОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ШТАММОВ-КАНДИДАТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Барт Наталья Геннадьевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел. 8(8422) 49-55-63;

Email: e.suldina2006@yandex.ru

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, белковое профилирование, фитаза, нитрогеназа, щелочная фосфатаза, белки, протеомный анализ.

Ведение органического земледелия и применение органических и биологических удобрений и средств защиты- это не только перспективный, но и безопасный способ получения пищевых продуктов. Различные бактериальные композиции широко используются для увеличения микробной активности почвы, что повышает доступность питательных веществ, которые растения могут легко усваивать. Они повышают плодородие почвы, фиксируя азот и растворяя нерастворимые фосфаты в почве, в результате чего образуются химические вещества, способствующие росту растений. Целью данной работы стало определение наличия ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы у штаммов бактерий-кандидатов бактериальной композиции методом протеомного профилирования в полиакриламидном геле. Молекулярные массы фитазы, нитрогеназы и фосфатазы штаммов – кандидатов определяли в системе <http://molbiol.ru/> на основе аминокислотных последовательностей, после чего на фореграмме выявляли протеины, имеющие соответствующие молекулярные массы. По результатам протеомного анализа *Bacillus subtilis* у 10 штаммов были выявлены белки с молекулярными массами 50,5, 16,5 и 74,9 кДа, соответствующие ферментам фитазе, нитрогеназе и фосфатазе. У 6 штаммов *Bacillus megaterium* были выявлены белки с молекулярными массами 41,8, 16,7 и 24,8 кДа, соответствующие ферментам фитазе, нитрогеназе и фосфатазе. 4 штамма *Pseudomonas stutzeri* содержали белки с молекулярными массами 69, 31,8 и 73,5 кДа, соответствующие искомым ферментам. В результате проведенных экспериментов были определены кандидатные бактериальные штаммы для разработки биокомпозиции для повышения коэффициента усвоения минеральных компонентов удобрений.

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области
в рамках научного проекта № 19-416-730004**

Введение

Глобальный спрос на сельскохозяйственную продукцию растет из-за увеличения численности населения [1]. На планете уже насчитывается 8 миллиардов человек и ожидается, что это число будет расти и достигнет 10 миллиардов в ближайшие 50 лет [2, 3, 4]. Поскольку население мира продолжает увеличиваться, растет и спрос на продукты питания. Следовательно, производство достаточного количества продуктов является важной задачей [5]. Для решения проблем нехватки продовольствия, вызванных ростом населения, используются различные технологии ведения сельского хозяйства, такие как использование химических или синтетических удобрений, пестицидов и инсектицидов,

что влечет за собой получение высоких урожаев в кратчайшие сроки [6]. Однако использование этих удобрений и инсектицидов вызвало большую озабоченность общественности по поводу безопасности и сохранности продуктов питания [7, 8]. Исследования показали, что значительное количество остатков пестицидов присутствует в пищевых продуктах еще долгое время после того, как они покидают фермы [9]. Следовательно, ведение органического земледелия и применение органических и биологических удобрений и средств защиты- это не только перспективный, но и безопасный способ получения пищевых продуктов [6, 10, 11].

Микроорганизмы поддерживают рост растений, увеличивая поступление питательных

веществ к растению-хозяину при внесении на разных этапах [2, 12, 13].

Различные бактериальные композиции широко используются для ускорения микробной активности, что повышает доступность питательных веществ, которые растения могут легко усваивать. Они повышают плодородие почвы, фиксируя азот и растворяя нерастворимые фосфаты в почве, в результате чего образуются химические вещества, способствующие росту растений [14]. Вносимые бактерии используют естественную биологическую систему мобилизации питательных веществ, что значительно повышает плодородие почвы и, как следствие, урожайность сельскохозяйственных культур [14]. Сообщалось, что по оценкам совокупный годовой темп роста рынка биоудобрений (CAGR) составил 14,0% с 2015 по 2020 год и, как ожидается, достигнет 1,88 млрд долларов США к 2025 году [15].

В связи с этим цель данной работы – определить наличие ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы у штаммов бактерий-кандидатов бактериальной композиции методом протеомного профилирования в полиакриламидном геле.

Материалы методы исследований

Штаммы бактерий:

B. subtilis 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 18, 19

B. megaterium 2, 3, 5, 9, 11, 12, 14

P. stutzeri 1, 2, 4, 5

Культуры бактерий обладали типичными для данных видов культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами [19].

Для накопления бактериальной массы штаммов была использована ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия); для удаления внеклеточных протеаз и белков летательной среды клетки центрифугировали при 5000g в течение 3 минут и суспендировали в калиево-фосфатном буфере температурой 37°C. Вторым этапом добавляли к осадку горячего (95°C) SDS буфера и тщательно перемешивали (ELMI CM-50, Чехия). Разрушение бактериальных клеток проводили на ультразвуковой гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE, Великобритания). Пробы инкубировали при 95°C в течение 5 минут. Образцы охлаждали до 20°C и вносили 250 мкл 2x буфера для образцов SDS-PAGE, инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Для получения бактериальных протеинов в супернатанте пробы центрифугировали при 12500g в течение 30 минут.

Согласно инструкции производителя ПААГ - Bio-Rad были подготовлены следующие рас-

творы:

1) Буферный раствор Трис-глициновый - 10x SDS-PAGE (1 L) – (250 mM Tris, 1.92 M glycine, 1% SDS, pH 8.3) - Tris base 30.3 g, Glycine 144.1 g, SDS 10 g, diH₂O to 1 L;

2) Буфер для образцов - 2x SDS-PAGE (Laemmli, 30 ml) – (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol) - 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 3.75 ml, 50% Glycerol 15.0 ml, 1.0% Bromophenol blue 0.3 ml, 10% SDS 6.0 ml, diH₂O to 30 ml, add β-mercaptoethanol (50 μl to 950 μl sample buffer) before use.

3) Раствор для окраски – на 100 мл – Coomassie Blue R250 – 0.25 g, methanol 45 ml, diH₂O 45 ml, acetic acid 10ml.

4) Проявляющий раствор – 10% acetic acid.

Электрофорез был проведен в камере для вертикального электрофореза (Mini-protean tetra, Bio-rad) в полиакриламидном геле 8-16 % (Criterion TGX, Bio-Rad). Маркер молекулярного веса 3,5-245 кДа (Abcam, Великобритания). Дальнейший анализ *in-silico* был проведен при использовании GelAnalyzer2010.

Результаты исследований

Молекулярные массы фитазы, нитрогеназы и фосфатазы определяли в системе <http://molbiol.ru/> на основе аминокислотных последовательностей.

Определение аминокислотного состава фитазы *Bacillus subtilis*

Длина белка: 463 аминокислот(ы)

Брутто-формула: C₂₂₃₁H₃₄₃₄N₅₉₄O₇₂₉S₁₀

Молекулярная масса: 50561.53 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: pI = 4.57

Определение аминокислотного состава нитрогеназы *Bacillus subtilis*

Длина белка: 151 аминокислот(ы)

Брутто-формула: C₇₂₅H₁₁₀₇N₁₇₅O₂₄₈S₁₀

Молекулярная масса: 16563.25 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: pI = 3.69

Определение аминокислотного состава фосфатазы *Bacillus subtilis*

Длина белка: 678 аминокислот(ы)

Брутто-формула: C₃₃₁₇H₅₁₁₆N₈₈₆O₁₀₆₅S₁₄

Молекулярная масса: 74894.62 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: pI = 4.56

Далее на фореграмме были выявлены протеины, имеющие соответствующие молекулярные массы (рис. 1-4).

По результатам протеомного анализа

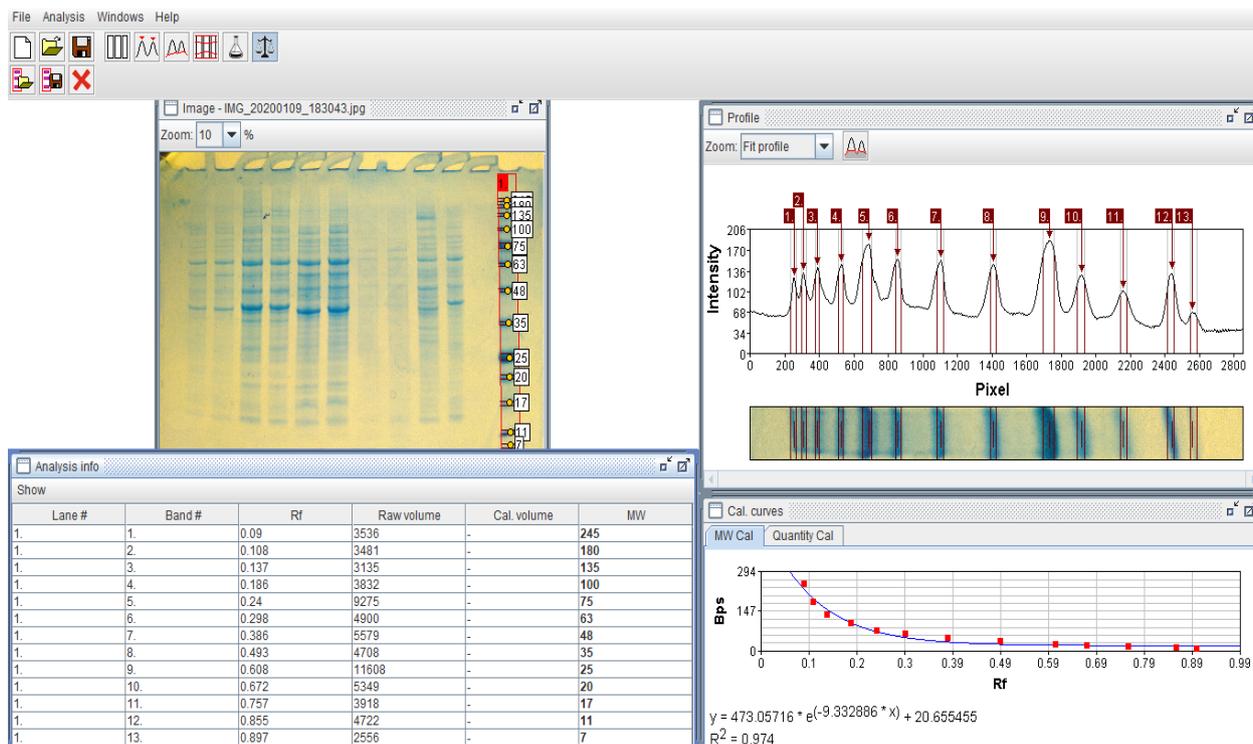


Рис. 1 - Построение калибровочного графика для белкового профиля *Bacillus subtilis*

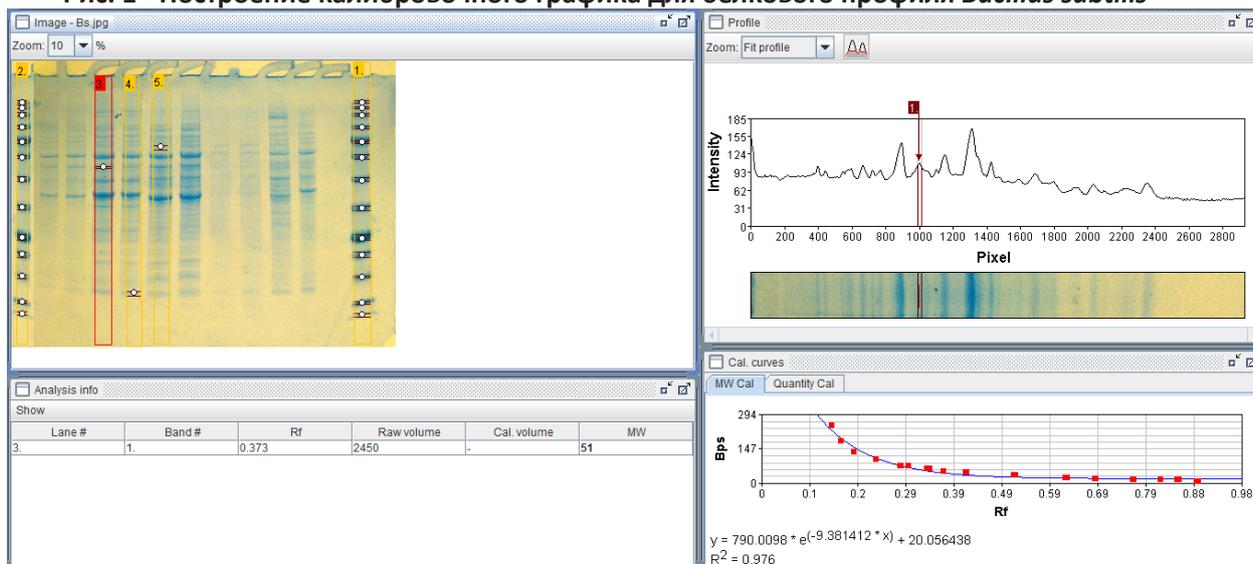


Рис. 2 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе фитазы (50,5 кДа) *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis у 10 штаммов были выявлены белки с молекулярными массами 50,5, 16,5 и 74,9 кДа, соответствующие ферментам фитазе, нитрогеназе и фосфатазе.

Определение аминокислотного состава фитазы *Bacillus megaterium*

Длина белка: 382 аминокислот(ы)

Брутто-формула: $C_{1858}H_{2868}N_{498}O_{599}S_1$

Молекулярная масса: 41797.9 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: pI = 4.93

Определение аминокислотного состава нитрогеназы *Bacillus megaterium*

Длина белка: 152 аминокислот(ы)

Брутто-формула: $C_{741}H_{1156}N_{182}O_{242}S_6$

Молекулярная масса: 16678.63 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: pI = 4.05

Определение аминокислотного состава фосфатазы *Bacillus megaterium*

Длина белка: 214 аминокислот(ы)

Брутто-формула: $C_{1130}H_{1809}N_{295}O_{312}S_9$

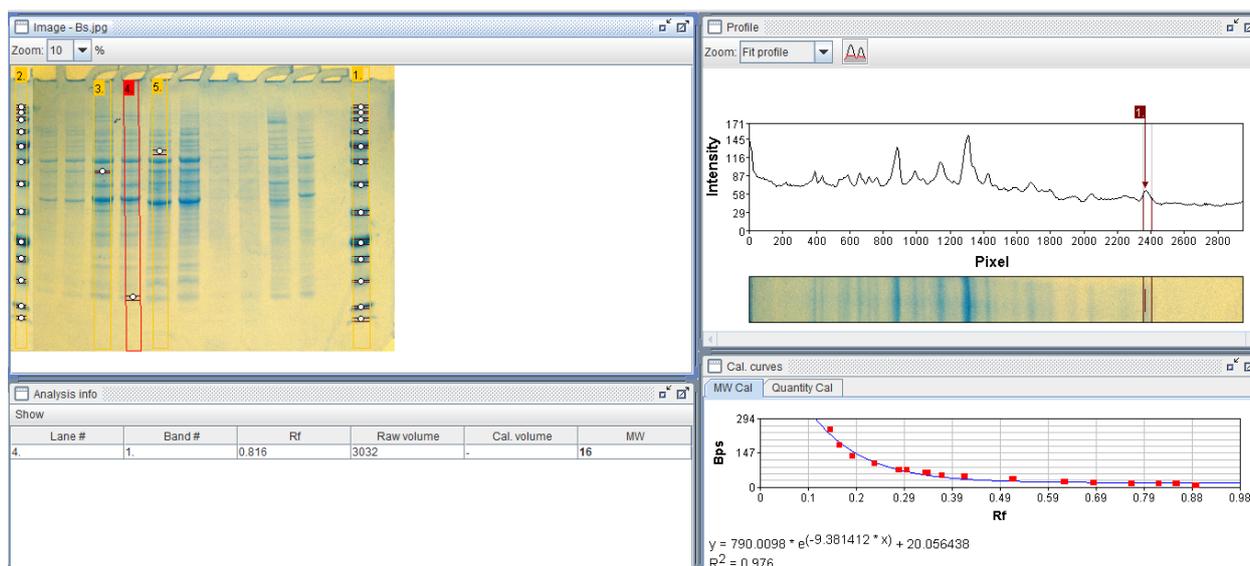


Рис. 3 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе нитрогеназы (16,5 кДа) *Bacillus subtilis*

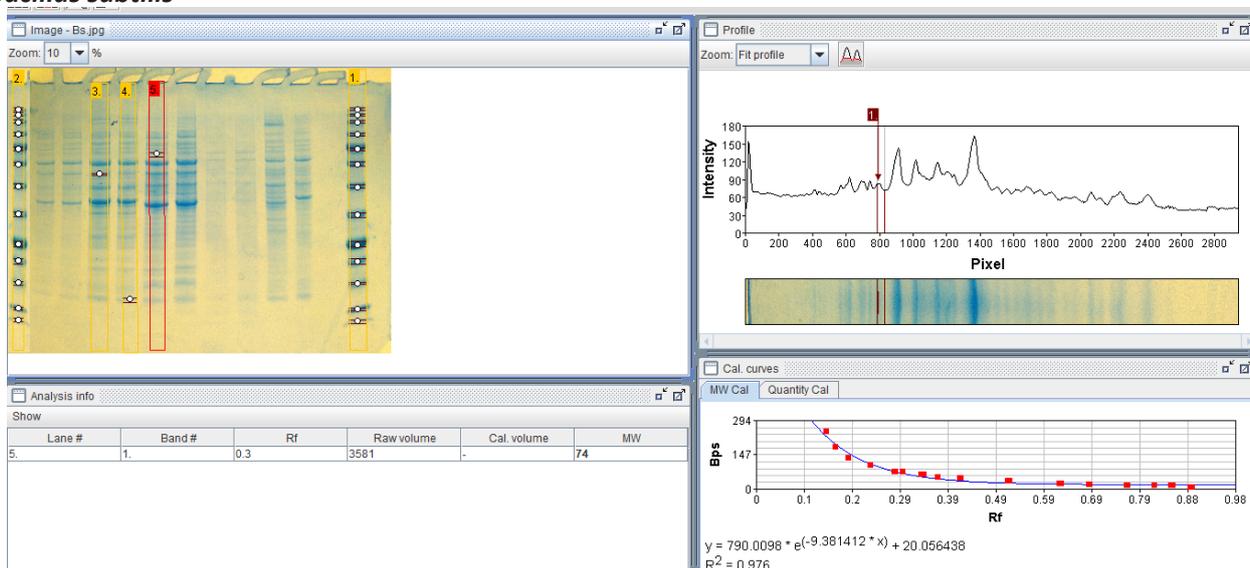


Рис. 4 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе фосфатазы (74,9 кДа) *Bacillus subtilis*

Молекулярная масса: 24807.93 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: $pI = 10.03$

Далее на фореграмме были выявлены протеины, имеющие соответствующие молекулярные массы (рис. 5-8).

По результатам протеомного анализа *Bacillus megaterium* у 6 штаммов были выявлены белки с молекулярными массами 41,8, 16,7 и 24,8 кДа, соответствующие ферментам фитазе, нитрогеназе и фосфатазе.

Определение аминокислотного состава фитазы *Pseudomonas stutzeri*

Длина белка: 638 аминокислот(ы)

Брутто-формула: $C_{3039}H_{4815}N_{879}O_{934}S_{13}$

Молекулярная масса: 69026.21 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: $pI = 4.81$

Определение аминокислотного состава нитрогеназы *Pseudomonas stutzeri*

Длина белка: 293 аминокислот(ы)

Брутто-формула: $C_{1377}H_{2235}N_{373}O_{440}S_{23}$

Молекулярная масса: 31793.25 Da (с учетом естественного содержания изотопов). Изоэлектрическая точка: $pI = 4.39$

Определение аминокислотного состава фосфатазы *Pseudomonas stutzeri*

Длина белка: 682 аминокислот(ы)

Брутто-формула: $C_{3204}H_{4923}N_{923}O_{1044}S_{16}$

Молекулярная масса: 73589.24 Da (с учетом естественного содержания изотопов)

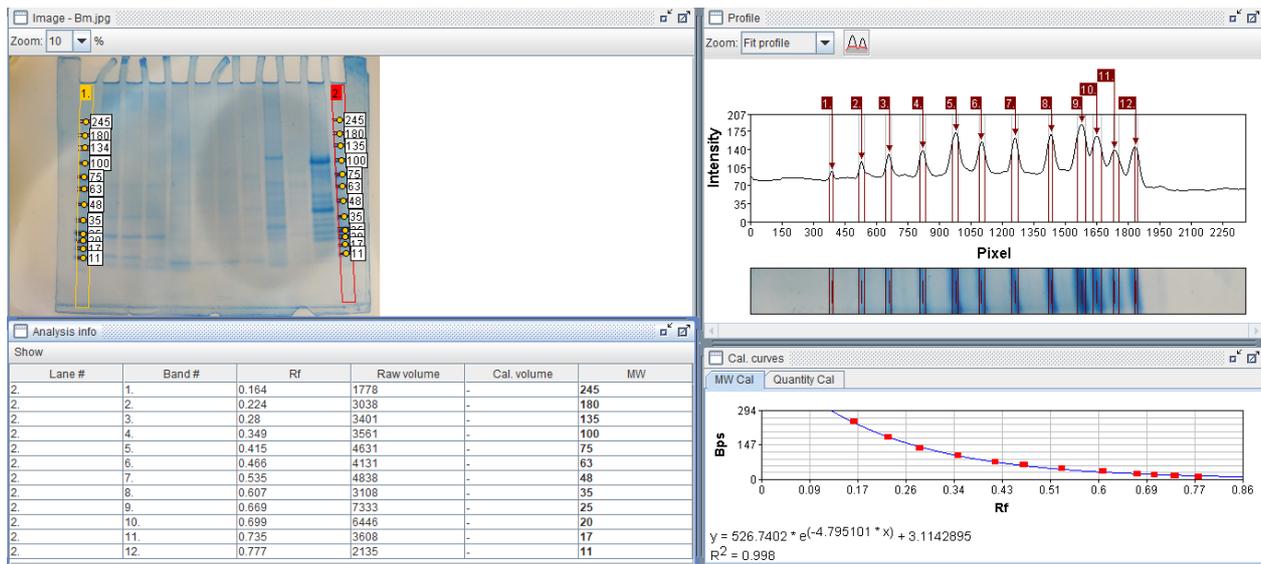


Рис. 5 - Построение калибровочного графика для белкового профиля *Bacillus megaterium*

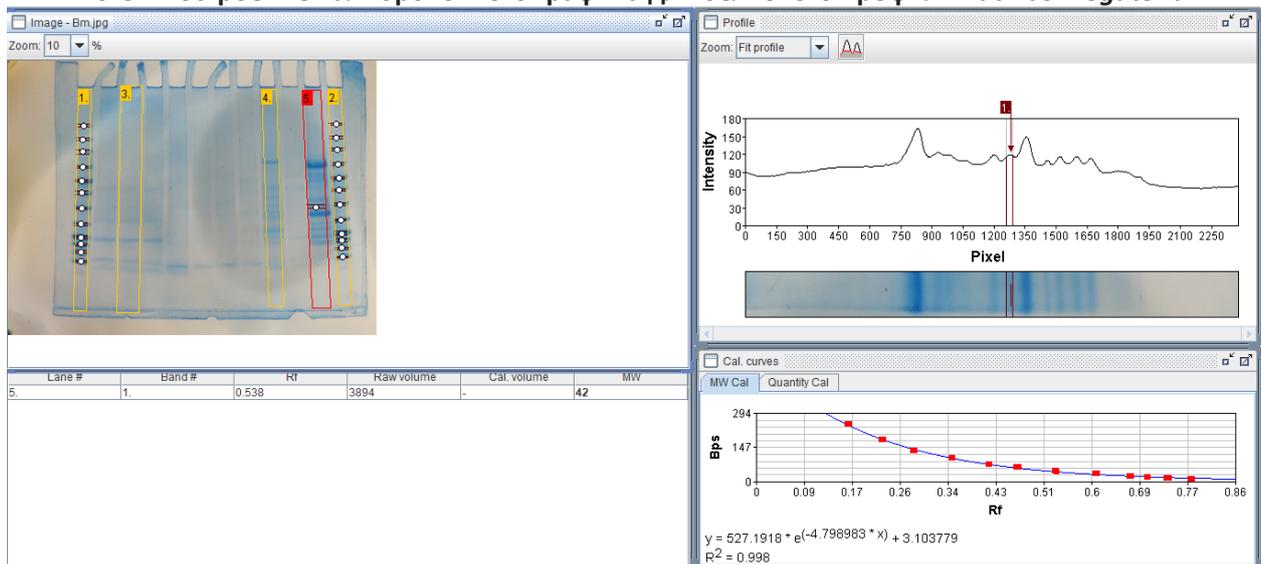


Рис. 6 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе фитазы (41.8 кДа) *Bacillus megaterium*

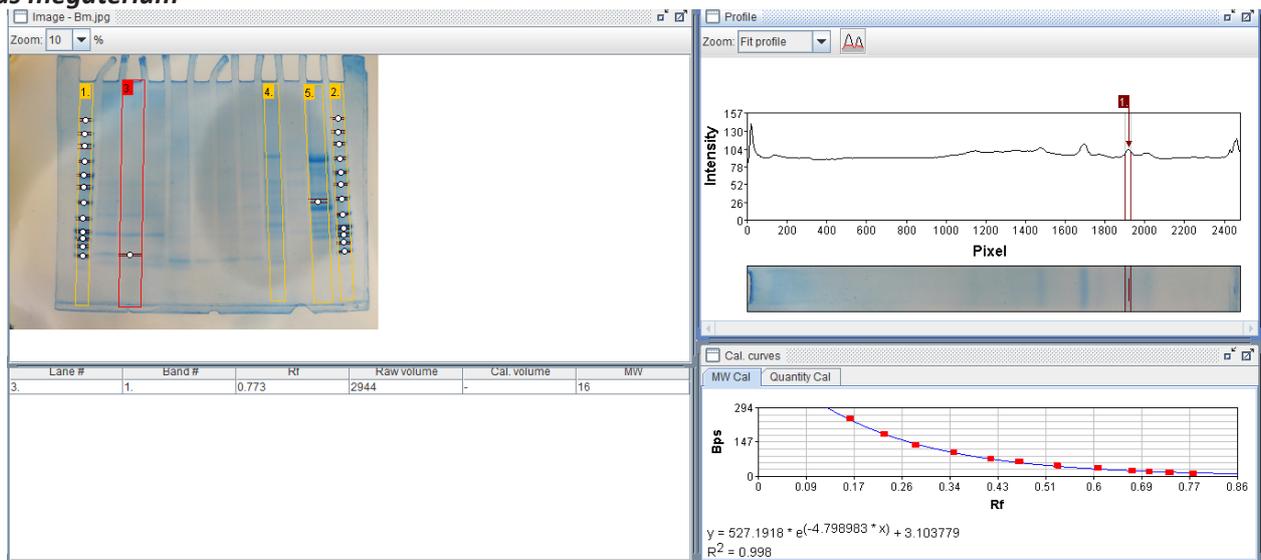


Рис. 7 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе нитрогеназы (16,7 кДа) *Bacillus megaterium*

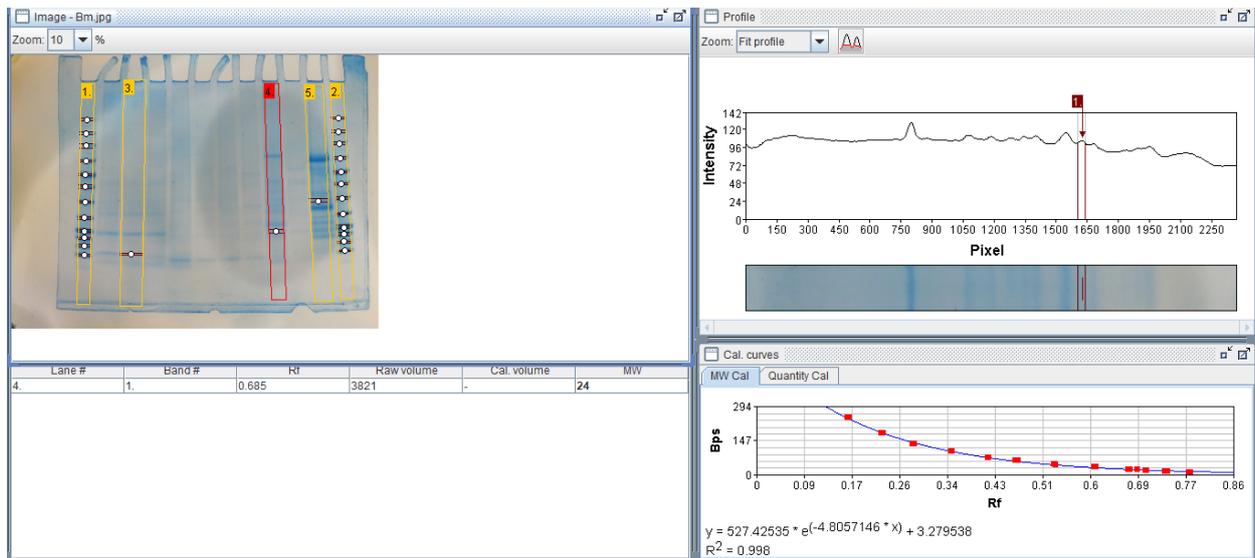


Рис. 8 -Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе фосфатазы (24,8 кДа) *Bacillus megaterium*

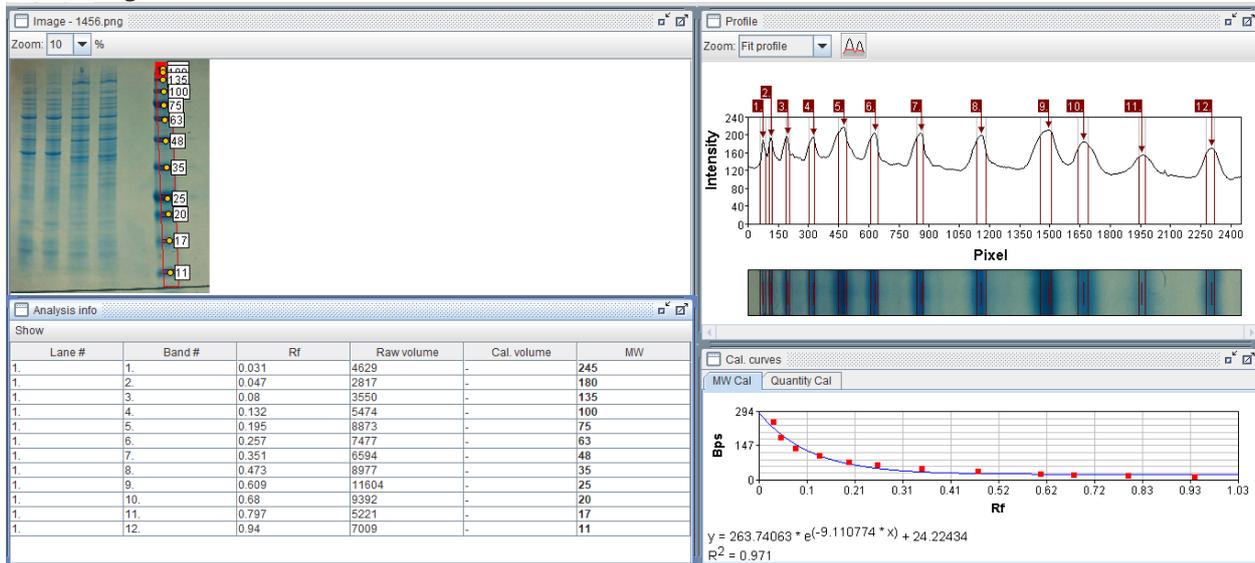


Рис. 9 - Построение калибровочного графика для белкового профиля *Pseudomonas stutzeri*

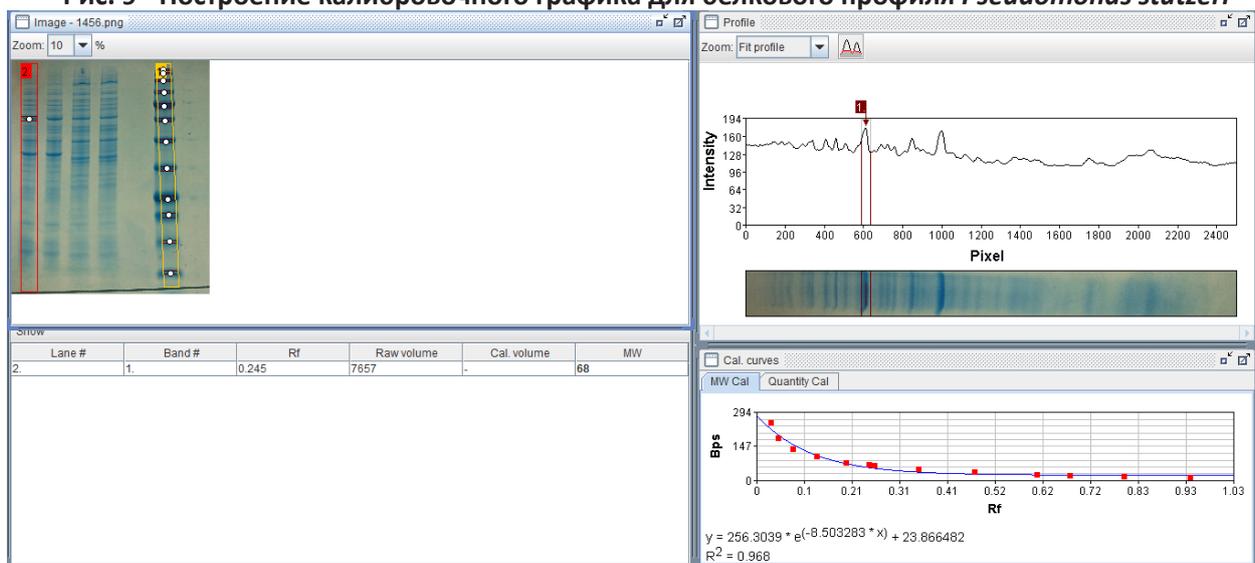


Рис. 10 -Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе фитазы (69 кДа) *Pseudomonas stutzeri*

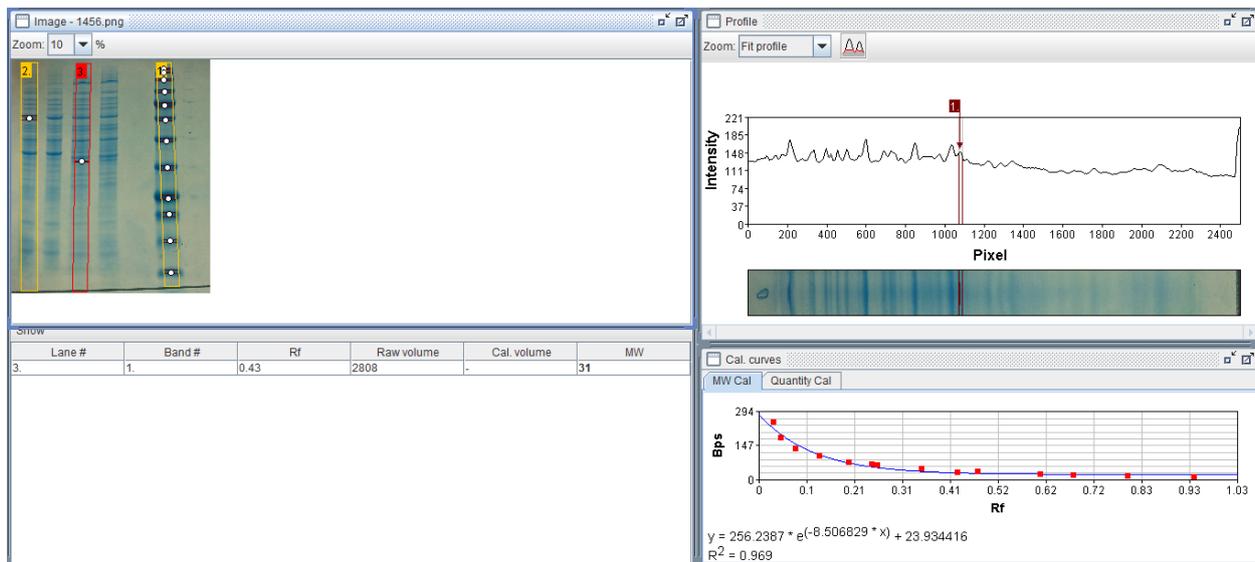


Рис. 11 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе нитрогеназы (31,8 кДа) *Pseudomonas stutzeri*

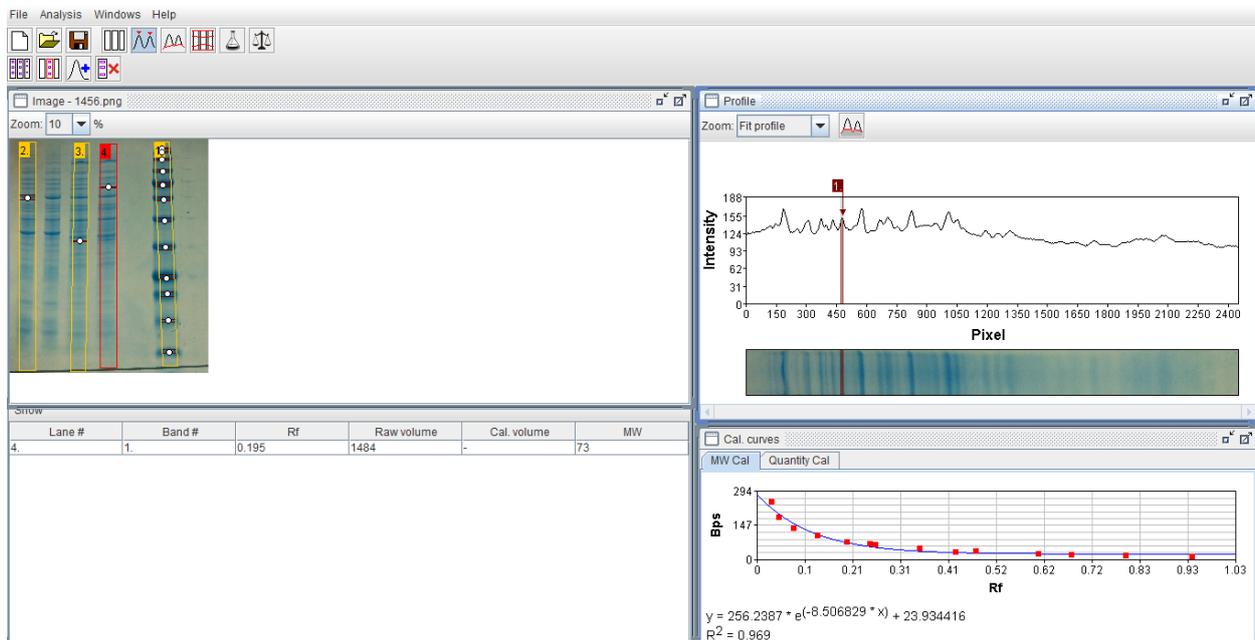


Рис. 12 - Выявление фрагмента, соответствующего молекулярной массе фосфатазы (73,5 кДа) *Pseudomonas stutzeri*

том естественного содержания изотопов). Изoeлектрическая точка: $pI = 4.49$

Далее на фореграмме были выявлены протеины, имеющие соответствующие молекулярные массы (рис. 9-12).

По результатам протеомного анализа *Pseudomonas stutzeri* у 4 штаммов были выявлены белки с молекулярными массами 69, 31,8 и 73,5 кДа, соответствующие ферментам фитазе, нитрогеназе и фосфатазе.

Обсуждение

Микробные инокулянты, также известные как биоудобрения, представляют собой органические продукты, содержащие специфиче-

ские микроорганизмы, полученные из корней и корневых зон растений. Было обнаружено, что они повышают рост и урожайность растений на 10-40% [16]. Эти биоинокулянты колонизируют окружающую среду при внесении в ризосферу и внутреннюю часть растения для стимулирования роста растений [4]. Они не только добавляют питательные вещества в почву и повышают плодородие почвы и урожайность сельскохозяйственных культур, но и защищают растения от вредителей и болезней. Было доказано, что они повышают выживаемость рассады, продлевают жизнь корневой системы, устраняют вредные химические вещества и сокращают время цве-

тения [17]. Растениям требуются 17 основных элементов для эффективного роста и развития, а азот, фосфор и калий требуются в значительных количествах [18].

В связи с этим разработка новых биоудобрений и инокулятов, в состав которых входят бактерии солюбилизирующие почвенные макроэлементы, -это перспективное направление исследований, не теряющее своей актуальности в ближайшие годы [19-20].

Заключение

В результате проведенных экспериментов были установлены молекулярные массы фитазы, нитрогеназы и фосфатазы для штаммов-кандидатов бактериальной композиции. По результатам протеомного анализа штаммов выявлены белки с соответствующими молекулярными массами. Таким образом, с помощью белкового профилирования в полиакриламидном геле подтверждена способность штаммов – кандидатов к продукции ферментов фитазы, нитрогеназы и фосфатазы.

Библиографический список

1. Batista B. D. et al. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability //Microbiological Research. – 2018. – Т. 206. – С. 33-42.
2. Kumar M. S. et al. Role of bio-fertilizers towards sustainable agricultural development: A review //Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. – 2018. – Т. 7. – №. 6. – С. 1915-1921.
3. Glick B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // Microbiological research. – 2014. – Т. 169. – №. 1. – С. 30-39.
4. Gouda S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture //Microbiological research. – 2018. – Т. 206. – С. 131-140.
5. Mahanty T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development //Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – Т. 24. – №. 4. – С. 3315-3335.
6. Egamberdieva D., Shrivastava S., Varma A. (ed.). Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – С. 287-303.
7. Liu Y., Pan X., Li J. Current agricultural practices threaten future global food production //Journal of Agricultural and Environmental Ethics. – 2015. – Т. 28. – №. 2. – С. 203-216.
8. Bruinsma J. et al. The resource outlook to 2050: by how much do land, water and crop yields need to increase by 2050? //How to feed the World in 2050. Proceedings of a technical meeting of experts, Rome, Italy, 24-26 June 2009. – Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. – С. 1-33.
9. Mishra P., Dash D. Rejuvenation of biofertilizer for sustainable agriculture and economic development //Consilience. – 2014. – №. 11. – С. 41-61.
10. Wang C. L. et al. Present situation and future perspectives of biofertilizer for environmentally-friendly agriculture //Extension Bulletin-Food & Fertilizer Technology Center. – 2010. – №. 634.
11. Youssef M. M. A., Eissa M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review //Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research. – 2014. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-6.
12. Malusa E., Vassilev N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers //Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – Т. 98. – №. 15. – С. 6599-6607.
13. Bardi L., Malusà E. Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms //Abiotic stress: New research. – 2012. – С. 1-57.
14. Mazid M., Khan T. A. Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview //International Journal of Agricultural and Food Research. – 2015. – Т. 3. – №. 3.
15. Raja N. Biopesticides and biofertilizers: ecofriendly sources for sustainable agriculture //Biofertil Biopestici. – 2013. – Т. 4. – №. 1. – С. 1-2.
16. Stewart W. M., Roberts T. L. Food security and the role of fertilizer in supporting it //Procedia Engineering. – 2012. – Т. 46. – С. 76-82.
17. Nosheen S., Ajmal I., Song Y. Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production //Sustainability. – 2021. – Т. 13. – №. 4. – С. 1868.
18. Bumandalai O. et al. Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds //International Journal of Aquatic Biology. – 2019. – Т. 7. – №. 2. – С. 95-99.
19. Umesha S., Singh P. K., Singh R. P. Microbial biotechnology and sustainable agriculture //Biotechnology for sustainable agriculture. – Woodhead Publishing, 2018. – С. 185-205.
20. Kamran S. et al. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat //Frontiers in microbiology. – 2017. – Т. 8. – С. 2593.

PROTEIN PROFILING OF CANDIDATE STRAINS OF BACTERIAL COMPOSITION

Suldina E. V., Bogdanov I. I., Feoktistova N. A., Bart N. G.
432017, Ulyanovsk, NovyiVenets boulevard, 1, tel.: 89374545651
e-mail: e.suldina2006@yandex.ru
FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

Key words: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas stutzeri*, lateral profiling, phytase, nitrogenase, alkaline phosphatase, proteins, proteomic analysis.

Organic farming and the application of organic and biological fertilizers and protective equipment is not only a promising, but also a safe way to obtain food products. Various bacterial compositions are widely used to increase the microbial activity of the soil, which increases the availability of nutrients that plants can easily absorb. They increase soil fertility by fixing nitrogen and dissolve insoluble phosphates in the soil, resulting in the formation of chemicals that promote plant growth. The aim of this work was to determine the presence of phytase, nitrogenase and alkaline phosphatase enzymes in strains of candidate bacteria of bacterial composition by proteomic profiling in polyacrylamide gel. The molecular weights of phytase, nitrogenase and phosphatase of candidate strains were determined in the system <http://molbiol.ru/> based on amino acid sequences. After that, proteins with the corresponding molecular weights were detected on the forogram. According to the results of proteomic analysis of *Bacillus subtilis*, proteins with molecular weights of 50.5, 16.5 and 74.9 kDa corresponding to the enzymes phytase, nitrogenase and phosphatase were identified in 10 strains. Proteins with molecular weights of 41.8, 16.7 and 24.8 kDa corresponding to the enzymes phytase, nitrogenase and phosphatase were detected in 6 strains of *Bacillus megaterium*. 4 strains of *Pseudomonas stutzeri* contained proteins with molecular weights of 69, 31.8 and 73.5 kDa corresponding to the required enzymes. As a result of the carried out experiments, candidate bacterial strains were identified for the development of a biocomposition to increase the coefficient of assimilation of mineral components of fertilizers.

Bibliography:

1. Batista B. D. et al. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability // *Microbiological Research*. – 2018. – T. 206. – C. 33-42.
2. Kumar M. S. et al. Role of bio-fertilizers towards sustainable agricultural development: A review // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2018. – T. 7. – №. 6. – C. 1915-1921.
3. Glick B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // *Microbiological research*. – 2014. – T. 169. – №. 1. – C. 30-39.
4. Gouda S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture // *Microbiological research*. – 2018. – T. 206. – C. 131-140.
5. Mahanty T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2017. – T. 24. – №. 4. – C. 3315-3335.
6. Egamberdieva D., Shrivastava S., Varma A. (ed.). Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – C. 287-303.
7. Liu Y., Pan X., Li J. Current agricultural practices threaten future global food production // *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. – 2015. – T. 28. – №. 2. – C. 203-216.
8. Bruinsma J. et al. The resource outlook to 2050: by how much do land, water and crop yields need to increase by 2050? // *How to feed the World in 2050. Proceedings of a technical meeting of experts, Rome, Italy, 24-26 June 2009*. – Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. – C. 1-33.
9. Mishra P., Dash D. Rejuvenation of biofertilizer for sustainable agriculture and economic development // *Consilience*. – 2014. – №. 11. – C. 41-61.
10. Wang C. L. et al. Present situation and future perspectives of biofertilizer for environmentally-friendly agriculture // *Extension Bulletin-Food & Fertilizer Technology Center*. – 2010. – №. 634.
11. Youssef M. M. A., Eissa M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review // *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. – 2014. – T. 5. – №. 1. – C. 1-6.
12. Malusa E., Vassilev N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – T. 98. – №. 15. – C. 6599-6607.
13. Bardi L., Malusa E. Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms // *Abiotic stress: New research*. – 2012. – C. 1-57.
14. Mazid M., Khan T. A. Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview // *International Journal of Agricultural and Food Research*. – 2015. – T. 3. – №. 3.
15. Raja N. Biopesticides and biofertilizers: ecofriendly sources for sustainable agriculture // *J Biofertil Biopestici*. – 2013. – T. 4. – №. 1. – C. 1-2.
16. Stewart W. M., Roberts T. L. Food security and the role of fertilizer in supporting it // *Procedia Engineering*. – 2012. – T. 46. – C. 76-82.
17. Nosheen S., Ajmal I., Song Y. Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production // *Sustainability*. – 2021. – T. 13. – №. 4. – C. 1868.
18. Bumandalai O. et al. Effect of *Chlorella vulgaris* as a biofertilizer on germination of tomato and cucumber seeds // *International Journal of Aquatic Biology*. – 2019. – T. 7. – №. 2. – C. 95-99.
19. Umeha S., Singh P. K., Singh R. P. Microbial biotechnology and sustainable agriculture // *Biotechnology for sustainable agriculture*. – Woodhead Publishing, 2018. – C. 185-205.
20. Kamran S. et al. Contribution of zinc solubilizing bacteria in growth promotion and zinc content of wheat // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – T. 8. – C. 2593.