



ПРОДУКЦИЯ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЯМИ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Лобанов А.Н.¹, Полюдова Т.В.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный аграрно-технологический университет им. академика Д.Н.Прянишникова, 614990, Россия, Пермь, ул. Петропавловская, д. 23.

²Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук - филиал ФГБУН Пермского ФИЦ УрО РАН, 614081, Россия, Пермь, ул. Голева, д. 13. E-mail: poludova76@mail.ru

Резюме

В работе исследованы пять штаммов *R. leguminosarum*, выделенных из клубеньков растений гороха. Оценкой кинематической вязкости бесклеточных культуральных жидкостей был установлен штамм бактерий (V30), у которого данный показатель превосходил в несколько раз показатели вязкости среды роста бактерий остальных штаммов и соответствовал значению 30 мм²/с. При экстракции этанолом из культуральной жидкости бактерий *R. leguminosarum* V30 был получен студенистый, прозрачный осадок полисахаридов, который после высушивания формировал светлый порошок, растворимый в воде. Проведённые исследования позволили выделить новый штамм бактерий *R. leguminosarum* с высоким биотехнологическим потенциалом, рост которых на дешевом субстрате позволяет за 5-6 суток получить большой объем культуральной жидкости с высокой кинематической вязкостью. Экстракция ценного метаболита *R. leguminosarum* осуществляется простым способом и позволяет выделить до 5 г полисахаридного препарата из 1 л культуральной жидкости.

Ключевые слова: кинематическая вязкость, периодическое культивирование; экзополисахариды; *Rhizobium*.

Цитирование: Лобанов А.Н., Полюдова Т.В. Продукция экзополисахаридов бактериями *Rhizobium leguminosarum* при периодическом культивировании // Биомика. 2020. Т.12(2). С. 224-231. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-13

© Авторы

PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES BY BACTERIA *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* DURING BATCH CULTIVATION

Lobanov A.N.¹, Poljudova T.V.^{1,2}

Perm State Agro-Technological University, 23 Petropavlovskaya Str., Perm, 614990, Russia
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
13 Goleva Str., Perm, 614081, Russia, E-mail: poludova76@mail.ru

Resume

Five strains of *R. leguminosarum* isolated from nodules of pea plants were studied in the work. The highest value of kinematic viscosity was observed in the growth medium of bacteria *R. leguminosarum* V30 and corresponded to a value of 30 mm²/s. Extraction with ethanol from the culture liquid of the bacteria *R. leguminosarum* V30 yielded a gelatinous, transparent precipitate of polysaccharides. After drying the gel, a light water-soluble powder was obtained. The studies made it possible to isolate a new strain of bacteria with a high biotechnological potential. The growth *R. leguminosarum* V30 on a cheap substrate makes it possible to obtain a large volume of culture liquid with high kinematic viscosity in 5-6 days. Extraction of the valuable metabolite *R. leguminosarum* V30 is carried out in a simple way and allows to isolate up to 5 g of a polysaccharide preparation from 1 liter of culture liquid.

Keywords: batch cultivation; kinematic viscosity, exopolysaccharides; *Rhizobium*.

Citation: Lobanov A.N., Poljudova T.V. Production of exopolysaccharides by bacteria *Rhizobium leguminosarum* during batch cultivation. *Biomics*. 2020. Vol. 12(2). P. 224-231. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-13 (In Russian)

© **The Authors**

Введение

Бактерии *Rhizobium* – это род почвенных и ризосферных бактерий, которые могут образовывать азотфиксирующие симбиозы с бобовыми растениями, позволяя им расти в бедных по азоту почвах. Благодаря этому свойству бактерии рода *Rhizobium* используются в качестве биоудобрений и инокулянтов в сельском хозяйстве более 120 лет, а молекулярно-бактериальные взаимодействия с растениями хорошо изучены. Известно, что для бактерий рода *Rhizobium* очень важным инструментом в колонизации растения-хозяина выступает выделение полисахаридной слизи, которая участвует в прикреплении бактериальной клетки к корневому волоску и запускает в клетке корня формирование нитей нодуляции. Для такого процесса необходимо постоянное и обильное выделение экзополисахаридов (ЭПС) [Глянко (Gljan'ko), 2015]. Вместе с тем, практически отсутствуют данные о возможности биотехнологического получения ценных ЭПС ризобий. Выделение ЭПС из бактерий имеют большую перспективу с точки зрения биотехнологии по сравнению с растительными полисахаридами. Регулируя рост микроорганизмов можно получать значительный выход целевого продукта, используя дешевые субстраты. Несмотря на более чем сорокалетнюю историю исследований, микробные ЭПС остаются объектами углубленных исследований. Благодаря таким важным свойствам, как эмульгирование и гелеобразование, они широко применяются в строительной, нефтяной, горнодобывающей, пищевой, парфюмерной, химической и текстильной промышленности, а так же в сельском хозяйстве. Кроме того, в последние годы значительно возросло количество исследований возможности применения экзополисахаридов в фармацевтике и медицине. Их рассматривают в качестве потенциального источника лекарственных субстанций, поскольку многие из них обладают иммуномодулирующим, антиоксидантным, противовоспалительным и антимикробным действием [Nwodo et al., 2012]. Потенциальные возможности промышленного применения экзополисахаридов обуславливают необходимость исследований в области их биосинтеза, изучения их состава, структуры, функциональных свойств и физиологии микроорганизмов-продуцентов, среди которых известны бактерии из разных таксономических групп. [Poli et al., 2010].

Целью настоящей работы явилось изучение параметров периодического роста и продукции ЭПС бактерий *Rhizobium leguminosarum*, выделенных из различных источников.

Материалы и методы

Бактерии разных штаммов *R. leguminosarum* выделяли из клубеньков растений гороха сортов Вельвет и Красноуфимский, выращенных на почвах с разным содержанием минерального азота [Алешин (Aleshin), 2018].

Выращивание бактерий проводили на бобовом отваре, который готовили путем кипячения 50 г белой фасоли в 1 л водопроводной воды в течение 20 мин. Полученный отвар после охлаждения фильтровали через ватно-марлевый фильтр. В экстракт добавляли в г/л: $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,3, сахарозу - 10. Для получения плотной питательной среды в готовый бульон добавляли бактериологический агар 15 г/л. Питательные среды стерилизовали автоклавированием в течение 15 мин при давлении пара 1,5 атм [Теппер и др. (Terper et al.), 1972].

Для выделения бактерий отбирали самые крупные клубеньки на корнях растения, помещали в 0,1 % раствор азидата натрия на 5 мин. После обеззараживания поверхности клубенька его раздавливали стерильным скальпелем, микробиологической петлей отбирали выделившуюся жидкость и производили посев истощающим штрихом на селективный бобовый агар. Инкубировали при температуре 25°C в течение 2 суток.

Идентификацию выделенных бактерий проводили по соответствию виду растения-хозяина, способности к росту на манните [Хоулт и др. (Hoult et al.), 1997]. Дифференциацию с бактериями рода *Agrobacterium* проводили с помощью теста на ломтиках моркови. По истечении срока инкубации (7-10 дней) на поверхности инокулированных ломтиков фиксировали наличие или отсутствие разрастаний тканей моркови [Davoodi, Hajivand, 2013].

Выращивание бактерий на бобовом отваре проводили в колбах Эрленмейера на 250 мл с объемом среды 50 мл. Засев производили с помощью микробиологической петли из колоний, сформированных на бобовом агаре. Культивировали с перемешиванием при 120 об/мин на орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan, Латвия) при температуре 25°C. В определенные интервалы времени отбирали аликвоты для определения оптической плотности культур на спектрофотометре ПЭ-5300 ВИ при 600 нм в кюветах с длиной оптического пути 10 мм. Также оценивали вязкость культуральной жидкости после отделения от неё бактериальных клеток с помощью центрифугирования (19000g, 15 мин). Вязкость среды роста бактерий определяли с

помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,73 мм, согласно прилагаемой инструкции.

Для выделения ЭПС использовали 5-6 суточную культуру. Клетки отделяли от среды центрифугированием в указанном выше режиме. Надосадочную жидкость упаривали на роторном испарителе Rotadest (МТА Kutesz, Венгрия) при 50-60°C до двукратного уменьшения объема. Упаренную культуральную жидкость вновь центрифугировали в том же режиме для удаления остатков клеток. Полученную надосадочную жидкость переносили в стеклянный мерный стакан и добавляли к ней 3 объема 96% охлажденного этанола. Тщательно перемешивали и выдерживали в течение 12 ч при температуре 4°C. После чего наблюдалось выпадение белого хлопьевидного осадка полисахаридов. Смесь центрифугировали, как указано выше, надосадочную спиртосодержащую жидкость удаляли, а осадок переносили на нейлоновый фильтр и дополнительно промывали этанолом. Отделённый гелеобразный осадок сушили течение 18-20 ч при 37°C, затем измельчали в ступке до получения однородного порошка, количество которого определяли гравиметрическим методом.

Определение растворимости полученного препарата ЭПС проводили путем внесения 5 мг сухого препарата ЭПС к 1 мл дистиллированной воды, 10 мМ Трис –HCl буфера с рН 7,2 и 8,8, или органических растворителей (этанол, изоамиловый спирт, этилацетат или диметилсульфоксид). Пробы перемешивали на шейкере Multi-Vortex V-32 (Biosan, Латвия) в течение 30 мин, затем оставляли в статическом состоянии при комнатной температуре.

Через 2 ч визуально оценивали наличие или отсутствие осадка.

Изучение УФ-спектра раствора ЭПС проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Япония) в диапазоне длин волн 190-1000 нм. Для исследования готовили раствор ЭПС, содержащий 5 мг/мл в дистиллированной стерильной воде, а также бесклеточную культуральную жидкость 6-суточной культуры и стерильный бобовый отвар.

Наличие или отсутствие функциональных групп в выделенном ЭПС определяли посредством проведения качественных реакций с резорцином и концентрированной серной кислотой (реакция Молиша), нингидрином, CuSO₄ в щелочной среде, с биуретовым реактивом [Малышева и др. (Malysheva et al.), 2010; Rühmann, 2015].

Результаты и их обсуждение

Для выделения симбиотических бактерий рода *Rhizobium* использовали клубеньки растений гороха сортов Вельвет и Красноуфимский пятинедельного возраста. Бактерии были выделены из клубеньков, имеющих на срезе розовый цвет, свидетельствующий о наличии леглобина, и следовательно, об азотфиксирующей активности *R. leguminosarum*.

Подтверждением принадлежности выделенных из корней бактерий к роду *Rhizobium* является их рост на бобовом агаре, который считается селективной средой для бактерий этого рода. Бактерии выделенные из всех растений формировали сходные по морфологии выпуклые колонии белого цвета, с глянцево-поверхностью с обильной слизью (Рис.1 А).

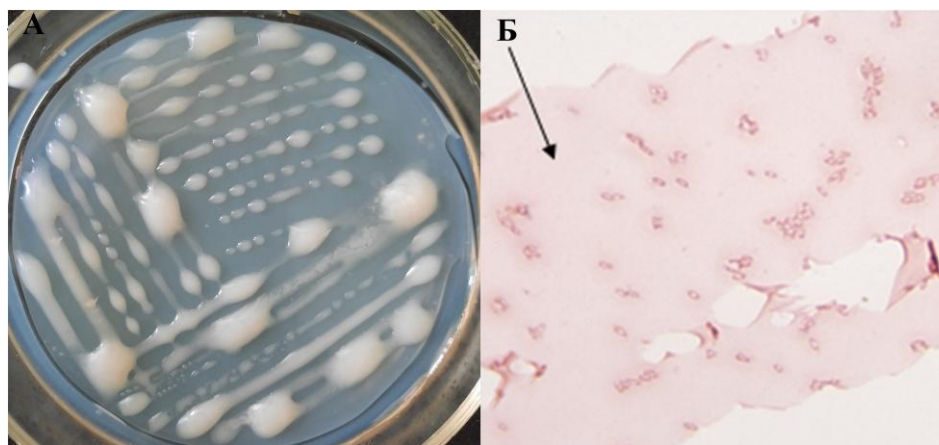


Рисунок 1. Колонии *R. leguminosarum* на поверхности бобового агара (А) и клетки, формирующие колонию, окрашенные по Граму, внедренные в слизистое вещество (Б) (указано стрелкой) (×1000).

Figure 1. Colonies of *R. leguminosarum* on the surface of bean agar (A) and cells forming a colony, stained by Gram, embedded in the mucous substance (B) (indicated by an arrow) (×1000).

Ещё одной отличительной особенностью бактерий рода *Rhizobium* является их способность расти на манните в виде единственного источника углерода, поэтому выделенные на бобовом агаре бактерии были перенесены на агар с маннитом, где также формировали слизистые белые колонии. Клетки, формирующие колонии обладали формой палочек и характеризовались грамтрицательным окрашиванием (Рис 1Б.). Для окончательного отнесения выделенных бактерий к виду *R. leguminosarum* был проведен тест на ломтиках моркови для дифференциации их с представителями близкородственного рода *Agrobacterium*. По окончании срока инкубации на морковных дисках не было обнаружено разрастаний тканей моркови.

Таким образом, выделенные из разных источников бактерии, по совокупности морфологических и физиологических признаков были отнесены к виду *R. leguminosarum*. Всего было выделено 5 штаммов, которые были обозначены в зависимости от сорта гороха и условий его выращивания. Для обозначения использовали первую букву из названия сорта гороха, выраженную латиницей, и цифру, обозначающую дозировку внесённого в почву азота, на которой были выращены растения.

При культивировании бактерий на жидкой питательной среде по мере их роста наблюдалось увеличение вязкости культуральной жидкости. Характер роста бактерий штаммов V15, V30, K30 и K45 в периодической культуре практически не отличался. В первые сутки культивирования наблюдалась фаза скрытого роста, до 3 суток – логарифмическая стадия, а далее стационарный период роста (Рис. 2А). Менее интенсивный рост наблюдался у бактерий, выделенных из клубеньков растений гороха сорта Вельвет, выращенных в почве без внесения минерального азота (штамм V0).

Вязкость среды роста отличалась в культурах разных штаммов. Так, на рисунке 2Б показано, что максимальное значение кинематической вязкости наблюдалось в культуре *R. leguminosarum* V30 на 5 сутки инкубации. Вязкость остальных культур была существенно ниже. Так, среди полученных изолятов бактерий *R. leguminosarum* был обнаружен штамм (V30), при культивировании которого на бобовом отваре наблюдалось максимальное, по сравнению с другими культурами, повышение вязкости культуральной жидкости. Это может свидетельствовать о сверхпродукции бактериями данного штамма внеклеточного вещества полисахаридной природы.

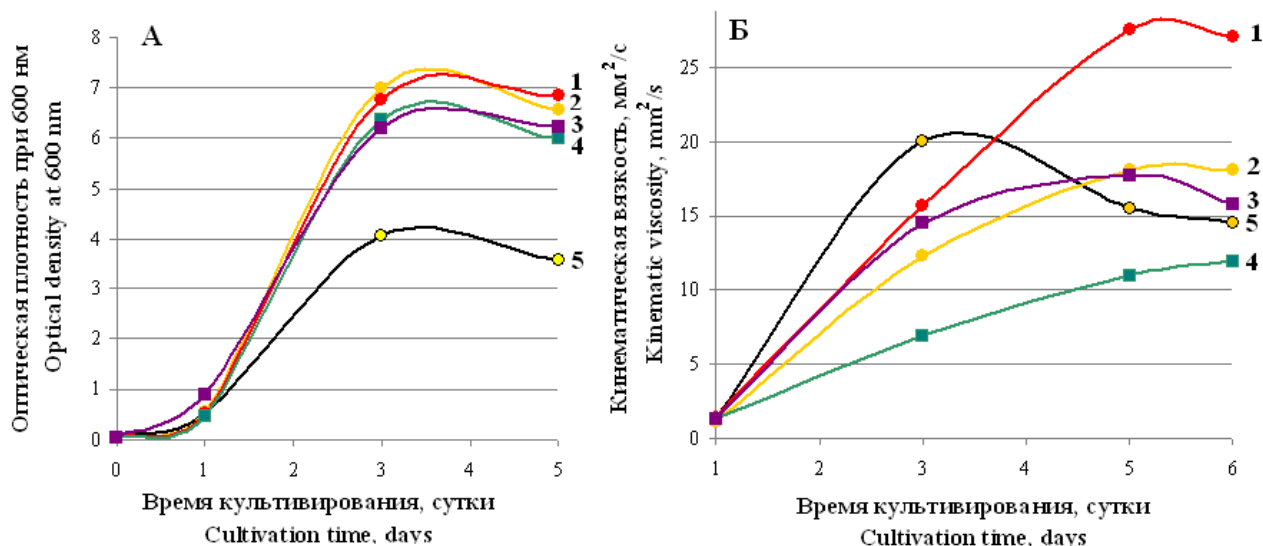


Рисунок 2. Кривые роста бактерий *R. leguminosarum*, выделенных из различных источников (А) и кинематическая вязкость бесклеточной культуральной жидкости (Б).

Figure 2. Growth curves of *R. leguminosarum* bacteria isolated from various sources (A) and the kinematic viscosity of the cell-free culture fluid (B)

1 - *R. leguminosarum* V30, 2 - *R. leguminosarum* V15, 3 - *R. leguminosarum* K45, 4 - *R. leguminosarum* K30, 5 - *R. leguminosarum* V0.

При изучении динамики роста *R. leguminosarum* V30 и продукции ЭПС было установлено, что максимальное значение вязкости достигается в середине логарифмической стадии развития культуры. Развитие бактерий в стационарной фазе не сопровождается накоплением ЭПС, о чем свидетельствует стабильное значение кинематической вязкости среды роста в этот период (Рис.3). Поэтому для получения культуры с максимальным показателем кинематической вязкости время инкубации определяется 5-6 сутками.

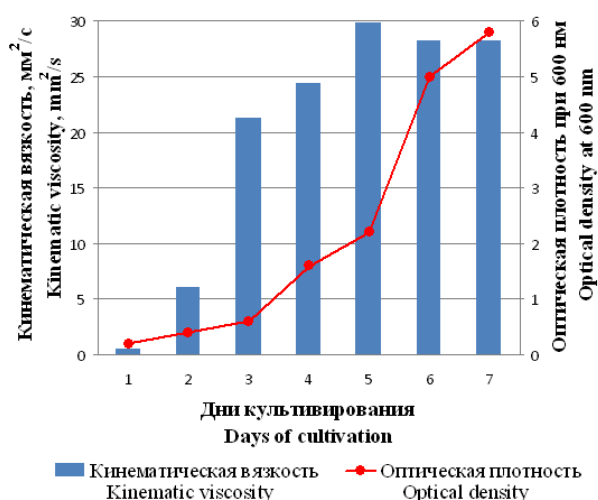


Рисунок.3. Динамика роста бактерий *R. leguminosarum* V30 и кинематической вязкости культуральной жидкости
Figure. 3. Dynamics of growth of bacteria *R. leguminosarum* V30 and kinematic viscosity of the culture liquid

Известно, что в качестве осадителя полисахаридов можно использовать этиловый спирт. При концентрации спирта 60-80% большинство полисахаридов выпадает в осадок, а низкомолекулярные примеси остаются в растворе [Rühmann, 2015]. При добавлении этанола к концентрату бесклеточной культуральной жидкости *R. leguminosarum* V30 сразу наблюдалось выпадение белого хлопьеобразного осадка, количество которого увеличивалось при охлаждении до +4°C и перемешивании. Отделённый от жидкости осадок представлял собой белое студенистое вещество (Рис.4А). Дегидратация полученного геля в сушильном шкафу при 37°C способствовала формированию плотной сухой корочки, которая легко измельчалась в порошок путём перетирания в ступке (Рис.4Б).

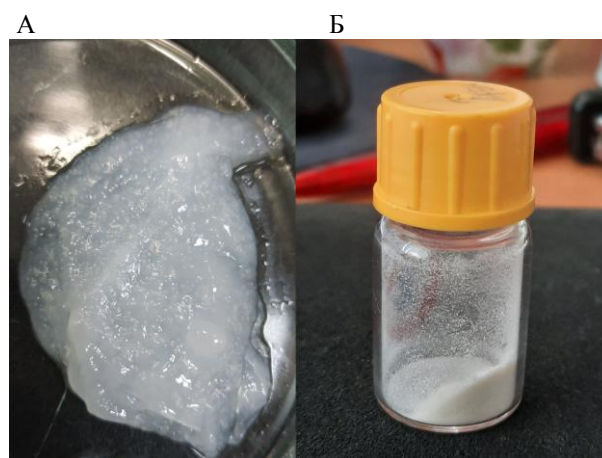


Рисунок 4. Гелеобразная полисахаридная субстанция (А) и полисахарид после высушивания и измельчения (Б).
Figure 4. Gel-like polysaccharide substance (A) and polysaccharide after drying and grinding (B).

Полученный препарат обладал хорошей растворимостью в водных средах с разным значением рН (5,5-дистиллированная вода; 7,2-10 мМ Трис-НСl буфер; 8,8-10 мМ фосфатный буфер) и в 9%-ной уксусной кислоте. В органических растворителях, таких как этанол, изоамиловый спирт, этилацетат и диметилсульфоксид ЭПС не был растворим.

Дальнейшие исследования полученного из среды роста *R. leguminosarum* V30 вещества были посвящены подтверждению его полисахаридной природы и оценке степени чистоты выделенного соединения. При проведении реакции Молиша, основанной на дегидратации углеводов концентрированной серной кислотой, наблюдалось образование красного соединения. Все углеводы (моно-, ди- и полисахариды), а также гликопротеины дают положительную реакцию Молиша, т.к. в результате появляются моносахариды. Поэтому наличие красного окрашивания было зафиксировано и в пробе со стерильной питательной средой и в бесклеточной культуральной жидкости *R. leguminosarum* V30. Также, все исследованные пробы дали положительную реакцию на ОН-группы с CuSO_4 , что свидетельствовало о наличии сахаров во всех пробах. Некоторые ЭПС бактерий могут быть образованы из мономеров, содержащих аминогруппу (аминосахаров). Качественной реакцией на свободные аминогруппы является тест с нингидрином. При взаимодействии нингидрина со свободными аминами и аммиаком развивается темно-синее или фиолетовое окрашивание. В наших экспериментах положительная нингидриновая реакция была выявлена в пробах со стерильной питательной средой и с культуральной жидкостью. Раствор выделенного из среды роста *R.*

leguminosarum V30 ЭПС не содержал свободных аминокислот и жидкости обусловлен наличием в них аминокислот и пептидных соединений. Положительный тест с нингидрином питательной среды и культуральной

Таблица 1 – Качественные реакции на выявление функциональных групп

Table 1 - Qualitative reactions to the identification of functional groups

Проба Sample	Реакция Молиша Molish reaction	Нингидриновая реакция Reaction with ninhydrin	Реакция с CuSO ₄ Reaction with CuSO ₄	Биуретовая реакция (белок, мг/мл) Biuret reaction (protein, mg/ml)
Раствор ЭПС EPS solution	++	-	+	1,02
Культуральная жидкость Culture liquid	+	+	+	4,98
Питательная среда Nutrient medium	+++	++	+	4,03
Вода Water	-	-	-	0

Обозначения: «+» - слабо выраженная положительная реакция; «++» - средняя степень проявления окраски при положительной реакции; «+++» - высокая степень проявления окраски при положительной реакции; «-» - отрицательная реакция.

Legend: «+» - a weakly expressed positive reaction; «++» - the average degree of color development with a positive reaction; «+++» - a high degree of color development with a positive reaction; «-» - negative reaction

Наличие пептидов и белков выявляли с помощью биуретового метода. Оказалось, что питательная среда содержит около 4 мг/мл белковых соединений, а культуральная жидкость около 5 мг/мл. В то же время выявлено, что примерно 1 мг/мл белка содержится в препарате, полученном из среды роста *R. leguminosarum* V30. Выявление в высокочувствительной биуретовой реакции белка, вероятно связано с недостаточной очисткой препарата от посторонних компонентов белковой или пептидной природы, присутствующих в культуральной жидкости. Анализ результатов, полученных при проведении качественных реакций позволяет предположить, что выделяемое бактериями *R. leguminosarum* V30 соединение является высокомолекулярным полисахаридом, в котором четко выявляются альдегидные группы (реакция Молиша) и свободные ОН-группы.

Раствор ЭПС, выделенного из среды роста бактерий *R. leguminosarum* V30 подвергли спектрофотометрии в УФ-диапазоне длин волн от 190 до 1000 нм. Полученный спектр сравнивали со спектром стерильной питательной среды (бобовый отвар с сахарозой) и бесклеточной культуральной жидкости, полученной после 6 суток культивирования бактерий. На рис. 5 представлены наложенные друг на друга спектры поглощения.

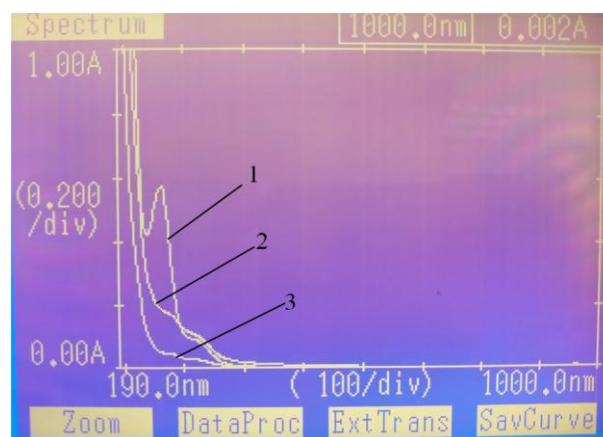


Рисунок 5. УФ-спектры поглощения: 1 –раствор ЭПС, 2 – бесклеточная культуральная жидкость, 3 – стерильная питательная среда

Figure 5. UV absorption spectra: 1 –EPS solution, 2 - cell-free culture liquid, 3 - sterile nutrient medium

Анализ спектров показал, что в растворе ЭПС регистрируется пик поглощения света длиной волны 230 нм. Это может свидетельствовать о том, что полученный препарат является концентратом основного продукта и содержит минимальное количество посторонних соединений. Данное исследование ещё раз подтверждает, что выделенное

нами соединение относится к классу полисахаридов, поскольку именно при длине волны 230 нм наблюдается максимальное поглощение света полисахаридными соединениями [Кузнецов и др. (Kuznetsov et al.), 2012].

В результате проведенных исследований выделен новый штамм бактерий, принадлежащий к виду *R. leguminosarum* и характеризующийся высокой продукцией внеклеточных полисахаридов в условиях периодического культивирования. Рост бактерий на дешевом субстрате позволяет за относительно короткий срок получить большой объем культуральной жидкости с высокой кинематической вязкостью. Экстракция ценного метаболита *R. leguminosarum* осуществляется простым способом и позволяет получить до 5 г сухого полисахаридного препарата из 1 л культуральной жидкости. Однако для увеличения выхода целевого продукта необходимы дополнительные исследования по оптимизации условий культивирования бактерий-продуцентов с целью получения культуральной жидкости с более высоким показателем вязкости и за меньший период инкубации. Кроме того оптимизации подлежат и условия выделения ЭПС из среды роста, которые позволят выделить ЭПС с меньшим количеством примесей, а также с возможным фракционированием полисахаридов по молекулярной массе, что неизбежно скажется на качестве искомого продукта.

Работа выполнена в рамках государственного задания, регистрационный номер НИОКТР АААА-А19-119112290009-1.

Литература

1. Алёшин М. А. Влияние инокуляции и доз азотных удобрений на крупяные свойства и урожайность посевного гороха в условиях дерново-подзолистой тяжелосуглинистой почвы Предуралья // *Пермский аграрный вестник*. 2018. №. 1 (21). С. 48-53
2. Глянко А. К. Сигнальные системы ризобий (*Rhizobiaceae*) и бобовых растений (*Fabaceae*) при формировании бобово-ризобияльного симбиоза (Обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. №. 5. С. 453-453. DOI: 10.7868/S0555109915050062
3. Кузнецов В. В., Кузнецов В. В., Романов Г. А. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Бином. Лаб. знаний, 2012. 487 с.
4. Малышева Ю. Б., Федоров А. Ю., Старостина Т. И. Идентификация органических веществ. Нижний Новгород: ННГУ, 2010. 34 с.
5. Мялова Л.А. Корневой рак плодовых культур в условиях юга Украины и меры борьбы с ними: сб. материалов конференции. *Фитонциды*.

Бактериальные болезни растений / Под ред. Гвоздяк Р.И [и др.]. Киев-Львов: КГТ-2,1990. Ч.2. С. 129-130.

6. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. Издательство «Колос». 1972г. 216 с.
7. Хоулт Дж., Криг Н. Определитель бактерий Берджи // М.: Мир. 1997. Т. 1. С. 432.
8. Davoodi, A., & Hajivand, S. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall disease on imported roses plants in qazvin province // *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 2013 , V. 3, № 2, pp. 117-124.
9. Nwodo U. U., Green E., Okoh A. I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects // *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. V. 13(11). P. 14002-14015. DOI: 10.3390/ijms131114002
10. Poli A., Anzelmo G., Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities // *Marine Drugs*. 2010. V. 8(6). P. 1779-1802. DOI: 10.3390/md8061779
11. Rühmann B., Schmid J., Sieber V. Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides // *Frontiers in microbiology*. 2015. V. 6. P. 565. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00565

References

1. Aleshin M. A. Influence of inoculation and nitrogen fertilizer doses on groat qualities of pea and its yield capacity in the conditions of sod-podzolic, heavy loamy soil of Preduralie. *Permskij agrarnyj vestnik*. 2018. No 1 (21). P. 48-53.
2. Davoodi A., Hajivand S. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall disease on imported roses plants in qazvin province. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*. 2013. V. 3(2). P. 117-124.
3. Glyan'ko A. K. Signaling Systems of Rhizobia (*Rhizobiaceae*) and Leguminous Plants (*Fabaceae*) upon the Formation of a Legume-Rhizobium Symbiosis (Review). *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia*. 2015. V. 51(5). P. 453-464. DOI: 10.1134/S0003683815050063
4. Holt J., Krieg N. Opredelitel' bakterij Berdzhii. М.: Мир. 1997. V. 1. S. 432. [Bergey's Manual of Systematic Bacteriology] (In Russian).
5. Kuznetsov V.V., Kuznetsov V.V., Romanov G. A. Molekuljarno-geneticheskie i biokhimicheskie metody v sovremennoj biologii rastenij. М.: Binom. Lab. znaniy, 2012. 487 s. [Molecular genetic and biochemical methods in modern plant biology] (In Russian).
6. Malysheva Ju. B., Fedorov A. Ju., Starostina T. I. Identifikacija organicheskikh veshhestv. Nizhnij Novgorod: NNGU, 2010. 34 s. [Identification of organic substances] (In Russian).

7. Mjalova L.A. Kornevoj rak plodovyh kul'tur v uslovijah juga Ukrainy i mery bor'by s nimi: sb. materialov konferencii. *Fitoncidy. Bakterial'nye bolezni rastenij*. Pod red. Gvozdjak R.I [et al.]. Kiev-L'vov: KGT-2, 1990. Ch.2. S. 129-130. [Root cancer of fruit crops in southern Ukraine and measures to eliminate it] (In Russian).
8. Nwodo U.U., Green E., Okoh A.I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. V.13(11). P. 14002-14015. DOI: 10.3390/ijms131114002
9. Poli A., Anzelmo G., Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*. 2010. V.8(6). P. 1779-1802.
10. Rühmann B., Schmid J., Sieber V. Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. 2015. V. 6. P. 565. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00565
11. Tepper E.Z., Shil'nikova V.K., Pereverzeva G.I. Praktikum po mikrobiologii. Izdatel'stvo «Kolos». 1972. 216 s. [Practical work on Microbiology] (In Russian).