

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ КАК МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ В КОЛЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦАХ РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А. В. Мищенко, Л. А. Масленникова, Д. К. Макаров, В. В. Солтис

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова»

Поступила в редакцию 26.02.2017 г.

**Аннотация.** В статье описывается методика молекулярного клонирования, используемая для идентификации фитопатогенов в коллекционных образцах редких и эндемичных видов растений Ульяновской области. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) в соответствии с протоколом изготовителя. Образцы гомогенизировались пластиковыми пестиками в пробирках типа Эппендорф на 1.5 мл и помещались для инкубации в литический раствор (Lysis Solution, Thermo Scientific), содержащий протеиназу К. Далее проводилось выделение нуклеиновых кислот на силиконовых колонках. Для успешной амплификации использован следующий протокол ПЦР. Праймеры подбирались к участку 16S рибосомальной ДНК (прямой – AGAGTTTGATCCTCCCTCAG и обратный – ACGGCTACCTTGTTACGACTT). Реакция велась в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей: 1х буфер, дезоксирибонуклеотиды (250 мкМ), праймеры (0.25 мкМ), taq-полимераза (10 ед.), деионизированная вода, матрица ДНК (3 мкл). Температурные параметры ПЦР: температурными параметрами: денатурация ДНК проходила при 94°C в течение 2 мин, циклирование – плавление матрицы при 94°C, 30 сек; отжиг праймеров при 55°C, 30 сек; элонгация цепи при 72°C, 1 мин (всего 30 циклов); окончательная достройка цепей проводилась при 72°C в течение 5 мин. ПЦР проводили с использованием амплификатора SpeedCycler 2 (Analytik Jena). В результате молекулярно-генетических исследований выявлено 4 вида бактерий, включающие только один болезнетворный вид для растений: *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) – фитопатоген, способный вызвать образование корончатых галлов; *Bacillus cereus*; *Bacillus pumilus* и *Pseudomonas fluorescens*. Важность такой фундаментальной проблемы, как скрининг наличия патогенов в культурах и образцах редких видов растений, вытекает из необходимости мониторинга состояния ботанических коллекций, которые могут подвергаться воздействию стрессовых неблагоприятных факторов и инвазии фитопатогенов. В ходе выполнения работы была предпринята попытка разработки лабораторных протоколов, позволяющих, при наличии оборудования для молекулярно-генетических исследований, выявлять патогены на поверхности семян редких растений, занесенных в Красные книги РФ и Ульяновской области.

**Ключевые слова:** редкие и эндемичные виды растений, фитопатогены, молекулярное клонирование, бактерии.

Сохранение редких и эндемичных видов растений Ульяновской области является важнейшей задачей "Стратегии сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов...в период до 2030 года" на региональном уровне (в соответствии с положениями Экологической доктрины Российской Федерации). Коллекционные образцы плодов и семян ценных растений нуждаются в постоянной проверке на предмет жизнеспособности и наличия патогенов, поскольку только качественный посевной материал, хранящийся

в банках культур, позволит в будущем воспроизводить и преумножать популяции охраняемых видов растений Ульяновской области. В связи с этим разработка новых молекулярно-генетических методов проверки инфицированности как семян, так и клеточных культур растений, скрининга жизнеспособности посевного материала, является весьма актуальной целью фундаментальных исследований нашего коллектива. Перспективы использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) в оценке качества растительного материала любой природы (вегетативные органы, плоды, семена, клеточные культуры и т.д.) позволяют в кратчайшие сроки определить широкий

© Мищенко А. В., Масленникова Л. А., Макаров Д. К., Солтис В. В., 2018

спектр фитопатогенов, которыми может быть заражён биоматериал, а также оценить его жизнеспособность. Уникальность и чувствительность ПЦР состоит и в том, что данный метод позволяет выявлять возбудителей заболеваний, не культивирующихся даже на селективных питательных средах, а также патогены, находящиеся в исследуемых образцах в весьма малых количествах.

При определении конкретных видов классическими методами с использованием посевов могут возникнуть затруднения, связанные с невозможностью культивировать бактерии отдельных видов на питательных средах и субъективными ошибками при проведении микробиологических исследований (неправильный забор и консервация биологического материала с микрофлорой, отсутствие навыков идентификации при микроскопии и пр.). Современные молекулярно-генетические методы исследования, например такие, как молекулярное клонирование, позволяют с высокой степенью достоверности определить в исследуемом образце (растительная ткань, клеточная культура и пр.), содержащем несколько микроорганизмов (метагеном), любой вид бактерий (в том числе патогенных). Целью данной работы являлась отработка метода молекулярного клонирования для определения видов бактерий, заселяющих коллекционные образцы редких и эндемичных растений Ульяновской области, хранящихся в Ульяновском государственном педагогическом университете имени И.Н. Ульянова. В коллекции насчитывается свыше 200 видов редких и эндемичных растений, занесённых в Красную книгу. Многие из них имеют большое значение как ценные медоносы, как лекарственные, эфирно-масличные, пищевые, индикаторные растения.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для определения бактериальных патогенов использовались навески семян массой 500 мг. Материал гомогенизировался в литическом растворе (содержащим додецилсульфат натрия) в течение 10 минут; после чего добавлялась протеаза К и проводилась инкубация при температуре 56°C продолжительностью 6 часов. Далее гомогенизат центрифугировался и из полученного супернатанта проводилось выделение ДНК на силиконовых колонках с помощью набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific).

В качестве генетического маркера использовали участок гена 16S рибосомальной РНК, который фланкировали праймерами: прямой

– AGAGTTTGATCCTCCCTCAG и обратный – ACGGCTACCTTGTTACGACTT. Для успешной амплификации фрагмента был подобран состав реакционной смеси для полимеразной цепной реакции (ПЦР): 1х буфер, дезоксирибонуклеотиды (250 мкМ), праймеры (0.25 мкМ), taq-полимераза (10 ед.), деионизированная вода, матрица ДНК (3 мкл). ПЦР проводили в пробирках объёмом 0.2 мл с использованием амплификатора SpeedCycler 2 (Analytik Jena) со следующими температурными параметрами: денатурация ДНК проходила при 94°C в течение 2 мин, циклирование – плавление матрицы при 94°C, 30 сек; отжиг праймеров при 55°C, 30 сек; элонгация цепи при 72°C, 1 мин (всего 30 циклов); окончательная достройка цепей проводилась при 72°C в течение 5 мин. После завершения реакции по 5 мкл смеси наносили на 1% агарозный гель для оценки качества ПЦР и разделения фрагментов; после чего готовился препаративный гель, из которого проводили выделение и очистку фрагментов нужной длины (около 1400 п.о.) (при этом использовали набор GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific)).

Очищенные фрагменты гена 16S рибосомальной РНК бактерий лигировали с вектором pTZ57R/T по протоколу из набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), при этом готовили смесь, содержащую компоненты: 5X Ligation Buffer, Vector pTZ57R/T (55 нг/мкл), T4 DNA Ligase (5 у/мкл), очищенный ПЦР-продукт (10 мкл), деионизированная вода. По 2 мкл полученного лигата электропорировали (с помощью MicroPulser Electroporator, Bio-Rad) с 50 мкл суспензии компетентных клеток *Escherichia coli* (штамм DH5- $\alpha$ ). Для отбора трансформированных бактерий, суспензия клеток высевалась на чашки Петри с селективным LB-агаром, содержащим антибиотик ампициллин, индуктор IPTG и индикатор X-gal. Чашки с трансформантами инкубировались в течение 24 ч при температуре 37°C (в термостате LIB-010M, Daihan Labtech), после чего проводился визуальный отбор неокрашенных колоний *E. coli* и пересев на селективную жидкую LB-среду с ампициллином. Инкубацию проводили 24 ч при температуре 37°C и перемешивании в шейкер-инкубаторе LSI-3016A (Daihan Labtech).

Выделение плазмидной ДНК с фрагментами гена 16S рибосомальной РНК из трансформированных клеток проводили с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), концентрацию измеряли на спектрофо-

тометре ScanDrop (Analytik Jena). Сиквенсовую реакцию осуществляли по протоколу с набором BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) со следующим составом реакционной смеси: Ready Reaction Premix 2.5X, BigDye® Sequencing Buffer 5X, прямой праймер (3.2 пмоль), матрица ДНК (плазмидная, кол-во в зависимости от концентрации), деионизированная вода (до финального объёма – 20 мкл); для очистки использовали BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Life Technologies). Секвенирование проводили с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Life Technologies), полученные последовательности анализировали в программе Sequence Scanner 2 software (Life Technologies Corporation) [1].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Принадлежность фрагментов бактериальной ДНК определяли, сравнивая обработанные и скорректированные последовательности гена 16S рибосомальной РНК с депонированными ранее в базу GenBank [2]. Для учёта брались последовательности, давшие 100% совпадение по нуклеотидному составу с имеющимися в базе (Рис. 1). В итоге выявлено 4 вида бактерий, включающих только 1 патогенный для растений:

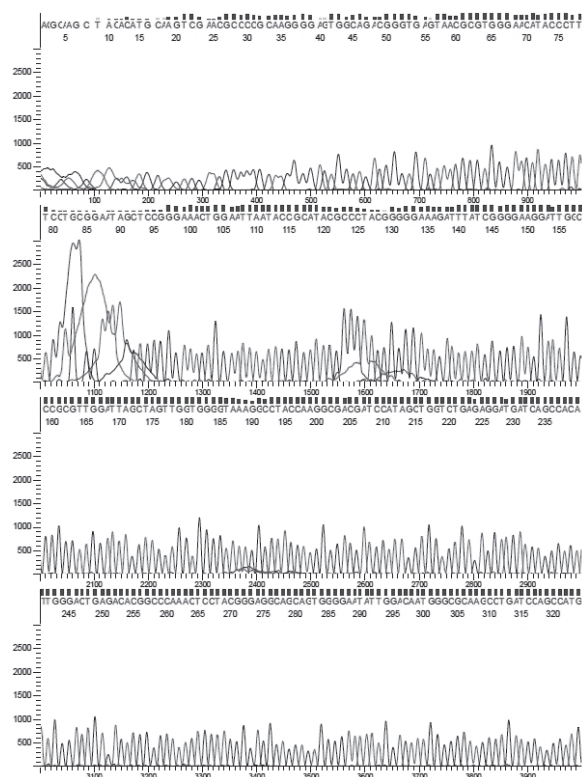


Рис. 1. Фрагмент хроматограммы гена 16S рибосомальной РНК фитопатогена *Agrobacterium tumefaciens* (получена с помощью генетического анализатора ABI PRISM 3500 и программы Sequence Scanner 2).

1) *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) – палочковидные грамотрицательные аэробные бактерии, обитатели почв. Является распространённым фитопатогеном, способным вызывать образование корончатых галлов. Некоторые источники указывают условную патогенность данного вида и для людей [3, 4, 5, 6].

2) *Bacillus cereus* – грамположительные спорообразующие почвенные бактерии. Не являются фитопатогенами, но способны вызывать пищевые токсикоинфекции у человека, образуя энтеротоксины [7, 8, 9, 10, 11].

3) *Bacillus pumilus* – почвенные аэробные грамположительные спорообразующие бациллы. По некоторым данным, развиваясь на корнях растений, могут быть антагонистами таких фитопатогенов, как представители родов *Rhizoctonia* и *Fusarium* [12, 13].

4) *Pseudomonas fluorescens* – грамотрицательные подвижные почвенные палочковидные бактерии. Вид активно используется для защиты культурных растений от грибковых заболеваний [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20].

Важность такой фундаментальной проблемы, как скрининг наличия патогенов в культурах и образцах редких и эндемичных растений, вытекает из необходимости постоянного мониторинга состояния коллекционных образцов, которые могут в течение длительного хранения терять жизнеспособность, подвергаться воздействию стрессовых неблагоприятных факторов и инвазии фитопатогенов. В ходе выполнения работы была предпринята попытка разработки лабораторных протоколов, позволяющих, при наличии оборудования для молекулярно-генетических исследований, выявлять фитопатогены в хранимых образцах семян редких растений. В данном случае применялась методика молекулярного клонирования, позволявшая разделить полученные фрагменты одного и того же бактериального гена для разных видов, и, в дальнейшем, идентифицировать их.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Ульяновской области в рамках научного проекта № 16-44-732017 "Разработка методов молекулярно-генетического скрининга жизнеспособности и наличия патогенов в клеточных культурах и коллекционных образцах редких и эндемичных видов растений Ульяновской области".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Life Technologies Corporation. Режим доступа: <http://www.lifetechnologies.com> (дата обращения: 02.02.2017).

2. GenBank. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (дата обращения: 02.02.2017).
3. Hulse M., Johnson S., Ferrieri P. Agrobacterium infections in humans: experience at one hospital and review // *Clinical Infectious Diseases*. 1993. № 16, pp. 112–117.
4. Dunne Jr. W. M., Tillman J., Murray J. C. Recovery of a strain of Agrobacterium radiobacter with a mucoid phenotype from an immunocompromised child with bacteremia // *Journal of clinical microbiology*. 1993. Vol. 31, № 9, pp. 2541–2543.
5. Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. Vol. 98, № 4, pp. 1871–1876.
6. Pitzschke A., Hirt H. New insights into an old story: Agrobacterium-induced tumour formation in plants by plant transformation // *The EMBO Journal*. Vol. 29, № 6, pp. 1021–1032.
7. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections // *Microbes and Infection*. 2000. Vol. 2, № 2, pp. 189–198.
8. Vilain S., Luo Y., Hildreth M., Brozel V. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte Bacillus cereus in Liquid Soil Extract and in Soil // *Applied Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, № 7, pp. 4970–4977.
9. Hoffmaster A., Hill K., Gee J., Marston C., De, B., Popovic T., Sue D., Wilkins P., Avashia S., Drumgoole R., Helma C., Ticknor L., Okinaka R., Jackson J. Characterization of Bacillus cereus Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to Bacillus anthracis and Harbor B. anthracis Virulence // *Journal of Clinical Microbiology*. 2006. Vol. 44, № 9, pp. 3352–3360.
10. Jensen G., Hansen B., Eilenberg J., Mahillon J. The hidden lifestyles of Bacillus cereus and relatives // *Environmental Microbiology*. 2003. Vol. 5, № 8, pp. 631–640.
11. Granum P., Lund T. Bacillus cereus and its food poisoning toxins // *FEMS Microbiology Letters*. 1997. Vol. 157, № 2, pp. 223–228.
12. Akhtar M. S., Shakeel U., Siddiqui Z. A. Biocontrol of Fusarium wilt by Bacillus pumilus, Pseudomonas alcaligenes and Rhizobium sp. on lentil // *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2010. Vol. 43, pp. 1423–1434.
13. Hill J. E., Baiano J. C. F., Barnes A. C., Isolation of a novel strain of "B. pumilus" from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens // *Journal of Fish Diseases*. 2001. Vol. 32, № 12, pp. 1007–1016.
14. Haas D., Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads // *Nature Reviews Microbiology*. 2005. Vol. 3, pp. 307–319.
15. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease // *Annual Review of Phytopathology*. 2003. № 41, pp. 117–153.
16. Molloy D. P., Mayer D. A., Giamberini L., Gaylo M. J. Mode of action of Pseudomonas fluorescens strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (Bivalvia: Dreissenidae) // *J. Invertebr. Pathol.* 2013. Vol. 113. № 1. pp. 115–121.
17. Gibb A.P., Martin K.M., Davidson G.A., Walker B., Murphy W.G. Rate of growth of Pseudomonas fluorescens in donated blood // *Journal of Clinical Pathology*. 1995. Vol. 48, № 8, pp. 717–718.
18. Gershman M.D., Kennedy D.J., Noble-Wang J. Multistate outbreak of Pseudomonas fluorescens bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy // *Clin. Infect Dis*. 2008. Vol. 47, Vol. 11, pp. 1372–1379.
19. Mavrodi D.V., Ksenzenko V. N., Bonsall R. F., Cook R. J., Boronin A. M., Thomashow L. S. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by Pseudomonas fluorescens // *J. Bacteriol.* 1998. № 180. pp. 2541–2548.
20. Fuller A.T., Mellows G., Woolford M., Banks G.T., Barrow K.D., Chain E.B. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by Pseudomonas fluorescens // *Nature*. 1971. Vol. 234, pp. 416–417.

Ульяновский государственный педагогический университет

\*Мищенко А. В., к.б.н., доцент кафедры географии и экологии

Тел.: +7 960 367-50-91

e-mail: a.misch@mail.ru

Ulyanovsk State Pedagogical University

\*Mishchenko A. V., PhD (biology), associate prof., department of geography and ecology, Ulyanovsk

Ph.: +7 960 367-50-91

e-mail: a.misch@mail.ru

Масленникова Л. А., к.б.н., доцент кафедры  
биологии и химии  
Тел.: +7 (8422) 44-30-69  
E-mail: leshvanov1987@yandex.ru

Maslennikova L. A., PhD (biology), associate  
prof., department of biology and chemistry  
Ph.: +7 (8422) 44-30-69  
E-mail: Leshvanov1987@yandex.ru

Макаров Д. К., аспирант кафедры географии  
и экологии  
Тел.: +7 (8422) 44-11-69  
E-mail: dk.makarov@mail.ru

Makarov D. K., post-graduate student, department  
of geography and ecology  
Ph.: +7 (8422) 44-11-69  
E-mail: dk.makarov@mail.ru

Солтис В. В., аспирант кафедры биологии и  
химии  
Тел.: +7 (8422) 44-30-69  
E-mail: vvsoltis@mail.ru

Soltis V. V., post-graduate student, department of  
biology and chemistry  
Ph.: +7(8422)443069  
E-mail: vvsoltis@mail.ru

## MOLECULAR CLONING AS A METHOD IN IDENTIFICATION OF BACTERIA IN COLLECTION SAMPLES OF RARE AND ENDEMIC SPECIES

A. V. Mishchenko, L. A. Maslennikova, D. K. Makarov, V. V. Soltis

*Ulyanovsk State Pedagogical University*

**Abstract.** The article describes the molecular cloning methods for detection of bacteria that inhabit the collection of rare and endemic species of plants of the Ulyanovsk region. DNA was extracted using the GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) according to the protocol provided by the manufacturer. Samples were homogenized with plastic pestles in 1.5-mL Eppendorf-type tubes and incubated in a lytic solution (Lysis Solution, Thermo Scientific) containing proteinase K. Further isolation of nucleic acids was performed on silicon columns. PCR protocol. Primers used were designed from the 16S ribosomal DNA (forward –AGAGTTTGATCCTCCCTCAG and reverse – ACGGCTACCTTGTTACGACTT). Reactions were performed in a volume of 20 µl containing: 10 mM PCR buffer 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM each dNTPs, 0.25 µM each primer, 10 U Taq DNA Polymerase, 3 µl extracted DNA. After 2 min denaturation at 94°C, the profile of amplification cycle was: 94°C × 30 sec, 55°C × 30 sec, 72°C × 2 min, performed 30 times, and a final extension step at 72°C × 5 min. The PCRs were done using a SpeedCycler 2 (Analytik Jena).

As a result of molecular-genetic studies of the surface of seeds, 4 types of bacteria are revealed, including only one pathogenic species for plants: *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*), phytopathogens that can cause the formation of crown galls; *Bacillus cereus*; *Bacillus pumilus*; *Pseudomonas fluorescens*. The importance of such fundamental issues as the screening of the presence of pathogens in the cultures and specimens of rare species of plants, stems from the need to monitor the state of host plants of rare species of insects, which can be exposed to stress and unfavorable factors of plant pathogens invasion. In the course of the work, an attempt to develop laboratory protocols was made to allow, in the presence of equipment for molecular genetic studies, to identify phytopathogens on the surface of the rare plant seeds, rare prey insect species listed in the Red Data Book of the Russian Federation and the Ulyanovsk Region.

**Keywords:** rare and endemic species of plants, phytopathogens, molecular cloning, bacteria.

### REFERENCES

1. Life Technologies Corporation. Available at: <http://www.lifetechnologies.com> (accessed 02 February 2017).
2. GenBank. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (accessed 02 February 2017).
3. Hulse M., Johnson S., Ferrieri P. *Agrobacterium* infections in humans: experience at one hospital and review. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, №16, pp. 112–117. DOI: 10.1093/clinids/16.1.112.
4. Dunne Jr. W. M., Tillman J., Murray J. C. Recovery of a strain of *Agrobacterium radiobacter* with a mucoid phenotype from an immunocompromised child with bacteremia. *Journal of clinical microbiology*, 1993, Vol. 31, № 9, pp. 2541–2543. PMID: 8408587.

5. Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, Vol. 98, № 4, pp. 1871–1876. DOI: 10.1073/pnas.041327598.
6. Pitzschke A., Hirt H. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. The EMBO Journal, Vol. 29, № 6, pp. 1021–1032. DOI: 10.1038/emboj.2010.8.
7. Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes and Infection, 2000, Vol. 2, № 2, p.p. 189–198. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)00269-0.
8. Vilain S., Luo Y., Hildreth M., Brozel V. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. Applied Environmental Microbiology, 2006, Vol. 72, № 7, pp. 4970–4977. DOI: 10.1128/AEM.03076-05.
9. Hoffmaster A., Hill K., Gee J., Marston C., De, B., Popovic T., Sue D., Wilkins P., Avashia S., Drumgoole R., Helma C., Ticknor L., Okinaka R., Jackson J. Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* Virulence. Journal of Clinical Microbiology, 2006, Vol. 44, № 9, pp. 3352–3360. DOI: 10.1128/JCM.00561-06.
10. Jensen G., Hansen B., Eilenberg J., Mahillon J. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. Environmental Microbiology, 2003, Vol. 5, № 8, pp. 631–640. PMID: 12871230.
11. Granum P., Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Letters, 1997, Vol. 157, № 2, pp. 223–228. PMID: 9435100.
12. Akhtar M. S., Shakeel U., Siddiqui Z. A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Rhizobium* sp. on lentil. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2010, Vol. 43, pp. 1423–1434. DOI: 10.3906/biy-0809-12.
13. Hill J. E., Baiano J. C. F., Barnes A. C., Isolation of a novel strain of "*B. pumilus*" from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. Journal of Fish Diseases, 2001, Vol. 32, № 12, pp. 1007–1016. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2009.01084.x.
14. Haas D., Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas* spp. Nature Reviews Microbiology, 2005, Vol. 3, pp. 307–319. DOI: 10.1038/nrmicro1129.
15. Haas D., Keel C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology, 2003, № 41, pp. 117–153. DOI: 10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656.
16. Molloy D. P., Mayer D. A., Giamberini L., Gaylo M. J. Mode of action of *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A, a lethal control agent of dreissenid mussels (*Bivalvia: Dreissenidae*). J. Invertebr. Pathol., 2013, Vol. 113. № 1. pp. 115–121. DOI: 10.1016/j.jip.2012.12.013.
17. Gibb A.P., Martin K.M., Davidson G.A., Walker B., Murphy W.G. Rate of growth of *Pseudomonas fluorescens* in donated blood. Journal of Clinical Pathology, 1995, Vol. 48, № 8, pp. 717–718. DOI: 10.1136/jcp.48.8.717.
18. Gershman M.D., Kennedy D.J., Noble-Wang J. Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. Clin. Infect Dis, 2008, Vol. 47, Vol. 11, pp. 1372–1379. DOI: 10.1086/592968.
19. Mavrodi D.V., Ksenzenko V. N., Bonsall R. F., Cook R. J.; Boronin A. M., Thomashow L. S. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens*. J. Bacteriol., 1998, № 180. pp. 2541–2548. PMID: 9573209.
20. Fuller A.T., Mellows G., Woolford M., Banks G.T., Barrow K.D., Chain E.B. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. Nature, 1971, Vol. 234, pp. 416–417. DOI: 10.1038/234416a0.