

СТРАТЕГИЯ
2019



МАТЕРИАЛЫ

IX Всероссийской конференции молодых ученых
«Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений
с окружающей средой»



ИБФРМ РАН, Саратов
14-18 октября 2019 г.

МИНОБРНАУКИ РФ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБФРМ РАН)
МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
«МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»
СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ ИБФРМ РАН

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

IX Всероссийская конференция молодых ученых
«Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений
с окружающей средой»

ИБФРМ РАН, Саратов
14–18 октября 2019 г.

При поддержке



Саратов
2019 г.

УДК 577.11; 577.114

ББК 28.4; 28.57

Ф94

Издается по решению
Оргкомитета конференции

Ф94 **Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с
окружающей средой:** Материалы конференции / IX Всероссийская
конференция молодых ученых, Саратов, 14–18 октября 2019 г. – Саратов: ООО
"Издательский Центр Наука", 2019. – 94 с.

ISBN 978-5-9999-3239-6

В сборнике представлены материалы докладов участников IX Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», организованной Советом молодых ученых ИБФРМ РАН. В работах рассматриваются актуальные проблемы экологии и симбиологии микробов и растений: адаптация микроорганизмов и растений к действию биотических и абиотических факторов окружающей среды; механизмы микробно-растительных взаимодействий; метаболическая и генетическая интеграция в растительно-бактериальных симбиозах; микробные и растительные метаболиты и их влияние на другие организмы; современные методы исследования микроорганизмов, растений и их сообществ; современные методы исследования микроорганизмов, растений и их сообществ.

Сборник представляет интерес для специалистов, работающих в области химии биополимеров, микробиологии и биохимии растений и микроорганизмов, а также для аспирантов и студентов вузов биологических, сельскохозяйственных и медицинских специальностей.

Материалы публикуются в авторской редакции.

© Издательский Центр Наука, 2019 г.

Дорогие коллеги!

Оргкомитет IX Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» приветствует вас с чувством глубокой признательности за участие в этом форуме, посвященном на этот раз памяти доктора биологических наук, профессора, Заслуженного деятеля науки РФ **Владимира Владимировича Игнатова**.

Профессор В.В. Игнатов стал директором-основателем, многолетним руководителем ИБФРМ РАН и созданной им научной школы, получившей статус одной из ведущих научных школ страны, чья деятельность посвящена разнообразным фундаментальным и прикладным аспектам взаимоотношений микроорганизмов и растений. В 1980-1990 годы, когда еще не были в широком употреблении такие понятия, как научная междисциплинарность, интеграция науки и образования и т.п., В.В. Игнатов предпринял много усилий к тому, чтобы объединить в создаваемом им Институте микробиологов и экспертов в области физиологии растений со специалистами в самых разных отраслях знаний – от химиков и экологов, до физиков-теоретиков. Большинству из них удалось интегрироваться в общую проблематику ИБФРМ РАН и найти себя в истинно междисциплинарных направлениях современной биологии, став участниками и руководителями работ в таких инновационных направлениях, как экологическая биотехнология, нанобиотехнология, биоинженерия и др. Благодаря такой организационной и кадровой политике были созданы условия для эффективного взаимодействия специалистов и взаимообогащения научных тем, развиваемых, в том числе, в рамках традиционных научных направлений – микробиологии, биохимии, генетики, краеугольных основ биологии, медицины, агрономической науки.

Будучи ученым, чьи работы в области биохимии и физиологии микроорганизмов получили широкую известность в нашей стране и за ее пределами, профессор В.В. Игнатов много внимания уделял преподавательской деятельности, работе с научной молодежью. По его инициативе в 1977 году в Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского (СГУ) была создана кафедра биохимии и биофизики, которой В.В. Игнатов руководил многие годы, даже выполняя сложную, многогранную работу на посту директора ИБФРМ РАН. Лучшие традиции российской профессуры были привнесены им и в деятельность Учебно-научного центра физико-химической биологии ИБФРМ РАН, организованного в 1998 году, целью которого является активное участие Института в подготовке высококвалифицированных специалистов с углубленными компетенциями в области биохимии, биофизики, молекулярной биологии и биоинформатики. Обучение в нем проходили и проходят студенты, обучающиеся в ряде подразделений СГУ биологической, химической, биофизической, нано- и биомедицинской направленности и т.п.

В разные годы профессор В.В. Игнатов был деканом биологического факультета СГУ, председателем Совета директоров академических учреждений города Саратова, возглавлял организованные им Саратовские отделения биохимического и микробиологического научных обществ при Академии наук, был членом коллегии Саратовского областного комитета охраны природы, входил в состав Совета по науке, технологиям и образованию при Правительстве Саратовской области. В.В. Игнатов был делегатом России в Федерации Европейских Микробиологических Обществ, являлся членом редколлегии журнала «Прикладная биохимия и микробиология».

Проводимая ныне конференция из целой серии подобных встреч, организованных в Саратове по инициативе В.В. Игнатова, будет очередным воплощением его идей в память о замечательном человеке и ученом Владимире Владимировиче Игнатове.

Д.х.н., проф. С.Ю. Щеголев,
зав. лабораторией иммунохимии ИБФРМ РАН,
директор ИБФРМ РАН с 2008 по 2017 гг.



**Механизмы микробно-растительных взаимодействий.
Метаболическая и генетическая интеграция в
растительно-бактериальных симбиозах**

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА БАКТЕРИЙ *Herbaspirillum lusitanum* P6-12

Багавова А.Р., Величко Н.С., Федоненко Ю.П.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
99bagavova@gmail.com

Herbaspirillum spp. грамотрицательные β -Proteobacteria широко распространенные в окружающей среде [1]. Представители практически всех видов данного рода, за исключением некоторых фитопатогенных штаммов, способны стимулировать рост и развитие растений. *Herbaspirillum lusitanum* P6-12 один из двух представителей рода гербаспирилл, обнаруженных в клубеньках бобовых. Полисахариды бактериальной поверхности, в том числе липополисахариды (ЛПС), являются медиаторами взаимодействия микроорганизмов с различными макрообъектами. Данные об исследовании химического состава ЛПС гербаспирилл представлены фрагментарно. В связи с этим задачей данного исследования стало выделение и характеристика ЛПС *H. lusitanum* P6-12.

Бактериальную культуру выращивали на жидкой синтетической среде с малатом и глюкозой до окончания экспоненциальной фазы роста. Ранее было показано, что капсульные полисахариды гербаспирилл являются экстраклеточной формой ЛПС, поэтому удаление капсулы с поверхности клеток являлось принципиально необходимым для предотвращения смешения гликополимеров поверхности. Капсульный материал с поверхности клеток отмывали 0,15 М NaCl в течение пяти суток, с ежедневной заменой отмывающего раствора. ЛПС экстрагировали из высушенных ацетоном бескапсульных клеток по методу Вестфаль без разделения слоев. Был получен ЛПС с выходом 5,4% от веса сухих клеток.

Для выявления макромолекулярной организации препарат ЛПС *H. lusitanum* P6-12 исследовали методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза с последующей визуализацией гликополимеров красителем на основе азотнокислого серебра. Большая часть макромолекул была сосредоточена в нижней части электрофоретического трека. В верхней части электрофореграммы были визуализированы две ярко выраженные узкие полосы. Это говорит о значительном преобладании в пуле мембранного ЛПС молекул R-формы. При окрашивании геля красителем Кумасси голубым R-250 была визуализирована одна полоса, соответствующая белку с массой ~ 30 кДа. Методом Бретфорд в этом препарате было выявлено ~ 3% белка.

Исследование биополимерного состава показало наличие всех характерных для ЛПС компонентов, а именно углеводов, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), а также жирных кислот (ЖК) липида А. Известно, что КДО является единственным структурным элементом, который всегда присутствует в ЛПС и является, своего рода маркером для этой молекулы, а профиль ЖК липида А – один из основных хемотаксономических критериев, используемых при классификации и идентификации микроорганизмов. Так, содержание углеводов в ЛПС составило 22,1%, а КДО ~ 0,4%. В препарате были обнаружены также остатки фосфорной кислоты (~ 6%). Анализ состава ЖК методом ГЖХ в виде метиловых эфиров показал преобладание в ЛПС додекановой (C12:0), 2-гидроксидодекановой (2-ОН-C12:0), 3-гидроксидодекановой (3-ОН-C12:0), гексадекановой (C16:0), 2-гидрокситетрадекановой (2-ОН-C14:0) кислот.

Моносахаридный состав исследовали методами тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии в виде ацетатов полиолов. В ЛПС были обнаружены нейтральные моносахара рамноза, галактоза, аминсахар глюкозамин и неидентифицированный аминсахар.

1. James *et al.* (1997) *J. Exp. Bot.* 48: 785–798.
2. Смолькина и др. (2012) *Микробиология.* 81: 345–352.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ БЕЛКА NifA, АКТИВАТОРА ГЕНОВ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА, ВНУТРИ ГРУППЫ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, Уфа

vladimirovaw@bk.ru

Клубеньковые бактерии являются симбиотическими микроорганизмами, способные к биологической фиксации азота в специализированных структурах на корнях бобовых растений – клубеньках. Однако, данный процесс могут осуществлять не только азотфиксирующие бактерии в симбиозе, но и свободноживущие микроорганизмы. В обоих случаях процесс фиксации молекулярного азота находится под контролем *nif*-генов (от англ. nitrogen fixation), кодирующих ферментный комплекс – нитрогеназу [1].

Основным регулятором запуска механизма фиксации азота является транскрипционный активатор – белок NifA [2]. Для исследования специфичности регуляторного белка NifA были использованы ранее созданные генно-инженерные конструкции (*pJB658* – промотор *Pm*, *pJN105* – промотор *ParaBAD*), где целевым геном являлись варианты гена *nifA*, принадлежащие следующим родам клубеньковых бактерий: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. На основе диких штаммов клубеньковых бактерий, отобранных из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН, были получены модифицированные варианты бактерий. Азотфиксирующую активность у полученных рекомбинантных штаммов определяли методом редукции ацетилена с использованием газового хроматографа (Shimadzu GC-2014, Япония). Было показано, что привнесение любого варианта активной копии гена *nifA* приводит к появлению азотфиксирующей активности у рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий в свободноживущем состоянии. Так же было отмечено, что азотфиксирующая активность имела различный уровень в зависимости от родовой принадлежности привнесенного гена *nifA*. Модифицированные штаммы *Rhizobium* sp. *V.syl3* и *V.syl9* имели наибольший показатель уровня азотфиксации при привнесении дополнительной копии гена *nifA* собственного рода под управлением промотора *ParaBAD* (0,17 мкг N₂/мл/ч и 0,15 мкг N₂/мл/ч, соответственно). На уровень нитрогеназной активности влияла и регуляция привнесенного гена. Так привнесение в штамм *V.syl9* дополнительной копии *nifA* гена рода *Mesorhizobium* под контролем промотора *Pm* показало меньший показатель, по сравнению с присутствием данной копии в этом же штамме, но под управлением другого промотора - *ParaBAD* (0,14 мкг N₂/мл/ч и 0,18 мкг N₂/мл/ч, соответственно). Аналогичная ситуация наблюдалась и в рекомбинантном штамме *L.zh3* с привнесенной копией *nifA* гена рода *Ensifer* (0,08 мкг N₂/мл/ч и 0,16 мкг N₂/мл/ч, соответственно). Для проверки влияния белка-активатора NifA на запуск нитрогеназной системы оценивали уровень наработки корового белка нитрогеназы NifH у исследуемых рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий. В зависимости от концентрации индуктора в среде были отмечены различные уровни наработки белка NifH. Таким образом, можно предположить, что белок NifA не является строго специфичным белком-активатором, поскольку при привнесении дополнительной копии *nifA* гена наблюдалось появление азотфиксирующей активности у клубеньковых бактерий вне зависимости от родовой принадлежности привнесенного гена *nifA*.

1. Rubio *et al.* (2002) *Nitrogen fixation at the millennium*. Elsevier Science BV. 101–136.
2. Martinez *et al.* (2004) *Journal of bacteriology*. 186 (19): 6586–6594.

*Исследование поддержано грантами РФФИ № 17-44-020201 p_a, № 18-34-00034 мол_a
УМНИК № 12605ГУ/2017*

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ АКТИНОМИЦЕТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЗАСОЛЕННЫХ ПОЧВ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Григорян Л.Н., Батаева Ю.В., Андреева Е.Д., Тураева З.О., Закарьяева Д.Х.

Астраханский государственный университет, Россия, Астрахань

lilyagrigoryan90@gmail.com

В связи с тем, что в процессе жизнедеятельности актиномицетов, в том числе и стрептомицетов, продуцируется комплекс вторичных продуктов обмена, который способен повышать всхожесть и качество растений возникла необходимость исследовать антиоксидантную активность данных микроорганизмов [1, 2].

Для оценки антиоксидантной активности семисуточной суспензии бактерий р. *Nocardiosis* №2, р. *Nocardiosis* №18, р. *Streptomyces* №11, а также их экстрактов (водно-спиртовые (80:20, 50:50, 20:80), метанольные и гексановые) использовали метод колориметрии свободных радикалов.

Анализ полученных данных показал, что изоляты актиномицетов характеризуются высокими значениями антиоксидантной активности относительно принятого стандарта аскорбиновой кислоты. Следует отметить, что все изучаемые образцы обладают показателями антиоксидантной активности, которые варьируют от 38,8% (водно-спиртовой экстракт 20:80 бактерий р. *Nocardiosis* №2) до 88,8% (суспензия бактерий р. *Streptomyces* №11), что существенно выше показателя аскорбиновой кислоты – 12,5%.

Антиоксидантная активность гексанового экстракта оказалась самой высокой у бактерий р. *Nocardiosis* №2 и составила 63,8%, а у бактерий р. *Streptomyces* №11 самой низкой – 37,2%. Наибольшее значение антиоксидантной активности метанольного экстракта установлено у бактерий р. *Nocardiosis* №18 и составило 59,0%, наименьшее у бактерий р. *Nocardiosis* №2 – 46,9%. Среди трех разных вариантов водно-спиртовых экстрактов достаточно высокий процент отмечен в модификации 20:80 бактерий р. *Streptomyces* №11 (76,0%), однако низкая антиоксидантная активность проявляется в такой же модификации водно-спиртового экстракта и составляет – 38,8%. Максимальный показатель антиоксидантной активности суспензии выявлен у бактерий р. *Streptomyces* №11 (88,8%), минимальный у бактерий р. *Nocardiosis* №18 (43,0%).

Однако отметим, что самый высокий показатель антиоксидантной активности по аскорбиновой кислоте зафиксирован в гексановом экстракте бактерий р. *Nocardiosis* №2 (63,8%).

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о проявлении антиоксидантной активности и, соответственно, содержании биологически активных веществ во всех анализируемых образцах изолятов актиномицетов, что подтверждает перспективность их дальнейшего изучения.

1. Поляк и др. (2017) *Вестник биотех. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 13(1): 18–25.
2. Widdick et al. (2018) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62: 13–18.

ЭНДОФИТНАЯ КОЛОНИЗАЦИЯ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ГРИБОМ *Beauveria bassiana*

Левченко М.В., Закота Т.Ю., Герус А.В., Конончук А.Г.

Всероссийский институт защиты растений, Россия, Санкт-Петербург
bagira036@mail.ru

Способность гриба *Beauveria bassiana* (штамм ББК-1) колонизировать растения в эндофитной форме оценивали на озимой пшенице *Triticum aestivum* L. Опыт был заложен в 2-х вариантах: замачивание семян и полив почвы. Перед инокуляцией семена были поверхностно стерилизованы 1%-м гипохлоритом натрия в течение 2 мин. и 70%-м этиловым спиртом с последующей трехкратной промывкой в дистиллированной воде. Инокуляция семян проводилась методом замачивания в водной суспензии конидий в концентрации 10^8 конидий/мл с добавлением 0,1% Tween 80 с экспозицией 20 ч. Контрольные семена замачивали в дистиллированной воде с добавлением 0,1% Tween 80.

Обработка почвы производилась методом полива конидиальной суспензией под каждое растение через семь дней после посева. Количество инокулюма составляло 1 л/кв.м. Обработка вегетирующих растений проводилась после появления всходов путем их опрыскивания конидиальной суспензией в той же концентрации. Через одну, две и три недели части растений (лист, стебель и корень) были отобраны для определения уровня их колонизации грибами. Предварительно с тест-растений были сняты основные биометрические показатели.

Доля колонизированных грибом растений в обоих вариантах была почти одинаковой. При замачивании семян доля колонизированных растений составила 50% от общего числа, а при проливе почвы – 45 %. Контрольные растения не показали наличия *B. bassiana*. Анализ данных по локализации гриба *B. bassiana* в растении при разных способах обработки грибом выявил, что вне зависимости от способа внесения, грибок присутствовал во всех проанализированных частях растения. При проливе почвы степень локализации гриба в корнях была выше в сравнении с замачиванием семян (63% и 50%, соответственно). В стеблях значение этого показателя при обработке почвы было почти в два раза меньше, нежели при инокуляции семян, составив 18 и 33%, соответственно. Локализация гриба *B. bassiana* отмечена и для листьев, на уровне 17-19%. Таким образом, при различных способах обработки пшеницы грибок *B. bassiana* локализовался преимущественно в корнях растений.

Исследование поддержано грантом РФФИ 18-316-00082-мол_a

УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ АССОЦИАЦИИ ПРИ КОИНОКУЛЯЦИИ КАРТОФЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ ДВУХ ВИДОВ РИЗОБАКТЕРИЙ *IN VITRO*

Костина Е.Е.¹, Каргаполова К.Ю.¹, Бурыгин Г.Л.^{1,2}, Ткаченко О.В.¹

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
kostinaee@yandex.ru

Рентабельность семеноводческого процесса и качество семенного материала прямо зависят от эффективности методов получения мини-клубней картофеля в производстве оригинальных семян картофеля [1]. Одним из перспективных подходов в повышении продуктивности и качества семенного материала картофеля, является инокуляция растений рост-стимулирующими ризобактериями, которые способны стимулировать рост и развитие микрорастений и повышать их устойчивость к абиотическому стрессу и фитопатогенам [2]. Бактеризация картофеля рост-стимулирующими ризобактериями улучшает развитие корневой системы микроклонов *in vitro*, стимулирует адаптацию полученных регенерантов к условиям *ex vitro*, а также способствуют увеличению урожая мини клубней в полевых условиях [3, 4]. В литературе имеются данные о преимуществах растительно-микробных ассоциаций, поддерживаемых в ряду поколений без реинокуляции [5].

Целью данной работы являлось создание и изучение устойчивых ассоциаций картофеля сорта Невский с бактериальными штаммами двух видов ризобактерий в условиях *in vitro*.

Коллекционные штаммы двух видов ризобактерий, не растущие на среде с сахарозой, были проанализированы на рост-стимулирующую активность по отношению к картофелю в условиях *in vitro*. Культуры штаммов двух видов были использованы для инокуляции картофеля с последующим клональным размножением полученных микрорастений в течение 5 поколений. Иммунохимическими методами установлено, что все штаммы сохранялись в ассоциации с растениями в течение всего эксперимента. Выявлены улучшения ростовых характеристик и приживаемости полученных микроклонов относительно стерильных растений. Полученные данные могут быть использованы в дальнейших фундаментальных и прикладных исследованиях.

1. Buckseth *et al.* (2016) *Sci. Hortic.* 204: 79–87.
2. Бойкова *и др.* (2015) *Аграрный науч. журнал.* 7: 3–7.
3. Tkachenko *et al.* (2015) *Agron. Sustain. Develop.* 35: 1167–1174.
4. Бурыгин *и др.* (2018) *Вестник биотех. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова.* 14(2): 12–16.
5. Barka *et al.* (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* 186: 91–95.

Данная работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-016-00116

ДОЗОЗАВИСИМЫЕ ЭФФЕКТЫ НИТРАТОВ ЛАНТАНОИДОВ В ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПЛАЗМАЛЕММНЫХ АКВАПОРИНОВ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ (*Zea Mays*)

Лаврентьева М.А., Воробьев В.Н.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань
masha2012l@yandex.ru

Известно, что РЗЭ могут повышать всхожесть семян, благоприятно влиять на фотосинтез, накопление биомассы, усвоение микро- и макроэлементов, что, в конечном итоге повышает урожайность растений [1]. Отсутствие информации о влиянии лантаноидов на параметры водного обмена в зоне растяжения корней явилось стимулом к проведению данного исследования, цель которого – провести сравнительный анализ дозозависимых эффектов влияния лантана и лютеция на экспрессию генов плазмалеммных аквапоринов.

Увеличение объема вакуоли при росте растяжением сопряжено с поступлением воды. Можно предположить, что изменения в интенсивности роста сопровождаются изменениями проницаемости плазмалеммы, которая в значительной степени определяется аквапоринами. Проведенные исследования дозозависимого изменения экспрессии плазмалеммных аквапоринов при действии $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ и $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3$ показали достоверные отличия от контроля только трех аквапоринов и только под влиянием лантана.

Основной вклад в увеличение водной проницаемости плазмалеммы вносят аквапорины семейства PIP2. Совместная экспрессия PIP1 и PIP2 приводит к большему увеличению проницаемости воды, чем при одиночной экспрессии PIP2. Этот эффект характерен для различных вариантов PIP1-PIP2 пар [2]. В наших исследованиях замечен факт совместной экспрессии PIP1;5 и PIP2;5 с коэффициентом корреляции $r=0,94$, что может свидетельствовать об увеличении водной проницаемости плазмалеммы при максимальной дозе поллютанта $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, что, в свою очередь, связано с развитием надземной части проростков и, соответственно, необходимостью обеспечения возросшего транспирационного спроса.

Сопоставление динамики роста с динамикой экспрессии аквапоринов показало отсутствие корреляции ($r=-0,31$) между этими процессами. Этот факт подтверждает представления о том, что первичным изменением при росте растяжением является изменение прочности связи между микрофибриллами целлюлозы первичной клеточной стенки, а не изменение тургорного давления за счет поступления в вакуоль большего объема воды обеспеченного аквапоринами [3]. Кроме того, резкое снижение экспрессии ZmPIP2;1 при дозах 10 и 15 мкМ никак не отразилось на росте в зоне растяжения клеток корня.

Отсутствие достоверных изменений в экспрессии плазмалеммных аквапоринов под влиянием $\text{Lu}(\text{NO}_3)_3$ вероятно связано с повышенной по сравнению с $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ токсичностью [4].

1. Vilela *et al.* (2018) *Aust. J. Crop Sci.* 5: 59–70.
2. Yaneff *et al.* (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 8: 180–195.
3. Горшкова. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 426 с.
4. Gonzalez *et al.* (2014) *Environ. Int.* 71: 148–157.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *Halomonas caseinilytica* EG33S7QL

Матевосян С.Г.¹, Ибрахим И.М.¹, Сигида Е.Н.², Федоненко Ю.П.^{1,2}, Коннова С.А.^{1,2}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
sona.matevosyan12@gmail.com

Благодаря своим уникальным свойствам многие представители *Halomonas* spp. могут активно расти в средах с высоким значением pH, высоким содержанием NaCl и в широком температурном диапазоне. У галофильных микроорганизмов полисахариды поверхности обеспечивают выживание в неблагоприятных условиях, удерживая воду, обеспечивая адгезию к твердым субстратам, связывая катионы металлов. У грамотрицательных бактерий активное участие во всех перечисленных процессах, обеспечивая устойчивость клеток в экстремальных условиях окружающей среды, принимают экстраклеточные полисахариды, а также липополисахариды (ЛПС) – основные компоненты внешней мембраны. Целью настоящей работы было выделение и характеристика ЛПС бактерий *Halomonas caseinilytica* EG33S7QL, изолированных из образца соли оз. Карун (Египет). Идентификацию бактерий проводили ранее [1]. Штамм был отнесен к умеренным галлофилам и характеризовался мукоидным фенотипом колоний.

Бактерии культивировали на среде ГРМ до окончания экспоненциальной фазы роста, осаждали клетки центрифугированием, ресуспендировали в 0,15 М NaCl и отмывали капсулу механическим перемешиванием. Клетки высушивали ацетоном и измельчали до порошкообразного состояния. Выход ацетонового порошка *H. caseinilytica* EG33S7QL составил 1,3 г/л. Экстракцию ЛПС из бактериальных клеток проводили модифицированным методом Вестфаль горячим водным фенолом без разделения фаз [2]. Выход ЛПС составил 23,4% от массы высушенных ацетоном клеток. Исследование биополимерного состава показало наличие всех характерных для ЛПС компонентов: углеводов (54,5%), включая 2-кето-3-дезоксиктоновую кислоту (0,1%), а также остатков фосфорной кислоты (2,6%). Анализ состава жирных кислот методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде метиловых эфиров показал преобладание в выделенном препарате 3-гидроксидодекановой и гексадекановой кислот. Моносахаридный состав исследовали методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов, что позволило выявить присутствие в ЛПС глюкозы (54,5%), рамнозы (40,4%) и N-ацетил-D-глюкозамина (5,1%).

Электрофоретический анализ ЛПС в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием нитратом серебра после периодатного окисления продемонстрировал преобладание S-форм молекул ЛПС, содержащих липид А, коровый олигосахарид и О-специфический полисахарид (ОПС). Визуализация полос в геле красителем толуйдиновым синим обусловлена наличием в ОПС отрицательно заряженных компонентов.

Мягким кислотным гидролизом ЛПС 2%-ной уксусной кислотой с последующим осаждением центрифугированием гидрофобного липида А и разделением водорастворимой фракции методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-50 был получен ОПС, выход которого составил приблизительно 62% от веса ЛПС, что согласуется с данными анализа биополимерного состава и результатами электрофоретического разделения.

1. Ибрахим и др. (2018) *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер.* 18(3): 345–353.

2 Westphal et al. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 83–91.

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ КАПСУЛЬНЫХ И МЕМБРАННЫХ ГЛИКАНОВ БАКТЕРИЙ *Azospirillum brasilense* Sp7

Мищенко С.С.¹, Каневский М.В.¹, Евстигнеева С.С.², Коннова С.А.¹

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
biolog322@yandex.ru

Известно, что ризобактерии р. *Azospirillum* вступают в ассоциативные отношения с обширным кругом сельскохозяйственных культур. Ранее показано, что флавоноиды растений, в частности кверцетин, при добавлении в среду выращивания индуцируют изменения в структуре О-специфических полисахаридов (ОПС) азоспирилл [1], которые могут способствовать формированию эффективных ассоциаций. ОПС, наряду с липидом А и коровым олигосахаридом, являются компонентами липополисахаридов (ЛПС) – основных структурных элементов внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Липид А обуславливает токсические свойства молекул ЛПС, а также выполняет роль якоря, закрепляющего углеводные структуры ЛПС во внешней мембране клеток. Ранее считалось, что гидрофобная составляющая ЛПС консервативна по структуре [2], однако, на данный момент получены сведения об изменениях состава и соотношения жирных кислот (ЖК) бактерий *A. lipoferum* Sp59b в зависимости от присутствия в среде флавоноидов [1]. Целью данной работы был анализ состава ЖК липидов А ЛПС и капсульных полисахаридов (КПС) типового штамма бактерий *A. brasilense* Sp7 в динамике выращивания в присутствии флавоноидов – кверцетина и рутина.

Культивирование бактерий *A. brasilense* Sp7 осуществляли в течение 24, 72 и 168 ч в жидкой среде LB с добавлением растворов кверцетина или рутина до конечной концентрации 125 мкМ. Капсульный материал смывали с поверхности бактерий при механическом перемешивании в 0,15 М NaCl в течение трех суток, а затем из высушенных ацетоном бактериальных клеток экстрагировали ЛПС [3]. Состав и соотношение ЖК в КПС и ЛПС определяли методом газожидкостной хроматографии в виде их метиловых эфиров [4].

В составе исследуемых гликополимеров были выявлены ЖК с длиной углеродной цепи от C14 до C19. Добавление в среду культивирования азоспирилл флавоноида рутина приводило к возрастанию содержания непредельных ЖК в случае КПС к первым суткам выращивания, однако дальнейшее увеличение продолжительности роста не сопровождалось изменениями состава ЖК. В липидах А ЛПС штамма Sp7 по мере роста в присутствии рутина наблюдалось постепенное перераспределение соотношения ЖК: к 24 ч в ЛПС доминировали 3-гидроксикислоты, к 72 ч содержание гидроксикислот и непредельных ЖК было приблизительно одинаково, а к 168 ч – резко возрастала доля непредельных кислот. Выращивание бактерий типового штамма в среде с кверцетином индуцировало увеличение содержания непредельных ЖК к 72 ч роста в полтора и пять раз для КПС и ЛПС соответственно. Известно, что соотношение предельных и непредельных ЖК оказывает существенное влияние на текучесть и прочность мембран бактерий. Выявленные нами тенденции изменения соотношения ЖК в КПС и ЛПС в динамике роста бактерий *A. brasilense* Sp7 при добавлении в питательную среду кверцетина и рутина указывают на важную функцию данных гликанов в реализации важнейших этапов формирования растительно-микробных ассоциаций с участием флавоноидов.

1. Каневский и др. (2014) *Микробиология*. 83(2): 143–151.
2. Wilkinson (1977) In: *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell*. London: Acad. Press. 97–175.
3. Кульшин и др. (1987) *Мол. генетика, микробиология и вирусология*. 5: 44–46.
4. Mayer et al. (1985) *Methods Microbiol.* 18: 157–207.

ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ, КАК СТРЕССОВЫЕ ФАКТОРЫ

Плюта В.А.¹, Мелькина О.Е.², Сидорова Д.Е.¹, Шевченко Н.А.³, Завильгельский Г.Б.², Хмель И.А.¹

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Россия, Москва

² «ГосНИИгенетика» НИЦ Курчатовский институт, Россия, Москва

³ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва
plyutaba@gmail.com

Микроорганизмы продуцируют летучие органические соединения (ЛОС), выполняющие разнообразные функции и играющие важную роль в межвидовой коммуникации организмов. Было показано, что ЛОС могут проявлять антимикробную активность и служить одним из факторов межвидовой борьбы. О механизмах действия многих ЛОС в настоящий момент известно мало.

В данной работе исследовано действие ЛОС на экспрессию генов *copA*, *arsR* и *zntA*, индуцируемых в клетке в ответ на наличие в среде ионов тяжелых металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+}) и мышьяка (As^{3+}) (продукты указанных генов участвуют в защите клеток от токсичных концентраций этих соединений). Изучены также закономерности совместного действия ЛОС и ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} и As^{3+} на экспрессию этих генов. Для оценки степени влияния ЛОС на экспрессию генов в работе были использованы специфические *lux*-биосенсоры – клетки *E. coli* MG1655, несущие плазмиды с репортером *lux*-опероном и клонированными промоторами генов *copA*, *arsR* и *zntA*. Степень экспрессии с соответствующих промоторов определялась по интенсивности биолюминесценции сенсора.

Показано, что исследуемые ЛОС (2-ундеканон, 2-нонанон, 2-гептанон, ацетон и диметилдисульфид) не активируют экспрессию генов *copA*, *arsR* и *zntA*. Только действие 2-пентанона (60 мкмоль) приводит к активации экспрессии люциферазных генов, находящихся под контролем индуцируемого промотора гена *zntA*. Наблюдается уменьшение степени экспрессии генов *copA*, *arsR* и *zntA* при совместном действии указанных ЛОС с водными растворами солей тяжелых металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+}) или мышьяка (As^{3+}) по сравнению с положительным контролем (действие CuSO_4 , ZnSO_4 или NaAsO_2 без ЛОС).

В работе также исследовалось действие ЛОС на ответ бактерий на окислительный стресс (ОС). Были использованы клетки *E. coli* MG1655, несущие плазмиды с клонированными промоторами *katG*, *soxS* и *oxyS* генов и репортером *lux*-опероном; *lux*-оперон транскрибировался с промоторов указанных генов в ответ на наличие в среде активных форм кислорода. Было показано, что исследуемые ЛОС не вызывают ОС. При предварительной обработке культуры биосенсора данными соединениями подавляется последующая индукция транскрипции с промоторов генов *katG* и *oxyS*, вызываемая перекисью водорода. Обсуждаются возможные механизмы влияния ЛОС на регуляторные белки и изменение проницаемости мембран клеток для ионов тяжелых металлов и мышьяка.

Было исследовано действие ЛОС, образуемых в наибольшем количестве ризосферными штаммами родов *Pseudomonas* и *Serratia*, на активность ферментов (бактериальных люцифераз) и на эффективность рефолдинга, проводимого бишаперонной системой DnaKJE-ClpB. Измерение кинетики и уровня рефолдинга термоинактивированных люцифераз проводили *in vivo* в клетках *E. coli* K12 BW25113 *ibpA⁺ibpB⁺* и JW3663*ibpB:kan*, содержащих гибридную плазмиду pLeo1 или pF2. Было показано, что кетоны и диметилдисульфид ингибируют DnaKJE-ClpB-зависимый рефолдинг люцифераз (наиболее сильное действие наблюдается, если отсутствует шаперон IbpB). Полученные результаты можно объяснить взаимодействием ЛОС с гидрофобными участками фермента и конкуренцией с шаперонами IbpAB.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ № 18-34-00396-мол_а, 18-04-00375-а и 19-04-00495-а

ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *Marinomonas ostreistagni* EG26S8QL

Сидорин А.С.¹, Ибрахим И.М.¹, Сигида Е.Н.², Федоненко Ю.П.^{1,2}, Коннова С.А.^{1,2}

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
sasha.sidorin2013@mail.ru

Экстраклеточные и мембранные полисахариды галофильных бактерий вызывают интерес исследователей как перспективные биополимеры, активно участвующие в адаптации и обеспечении нормальной физиологии микроорганизмов в засолённых средах, а также как потенциальные объекты для использования в различных биотехнологических процессах (коагуляция и эмульгирование нефти, фармацевтическая и пищевая промышленности и т.д.). Объектом исследования являлся штамм грамотрицательных галофильных бактерий *Marinomonas ostreistagni* EG26S8QL, выделенный из образца соли оз. Карун (Египет) и идентифицированный ранее на основании данных фенотипического исследования и анализа нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК [1]. Данный штамм характеризовался мукоидным фенотипом, продукцией ЭПС (1,5 г/л) и способностью к росту в присутствии 15% NaCl. Сведения о структуре липополисахарида (ЛПС) – основного компонента внешней мембраны грамотрицательных бактерий, *M. ostreistagni*, отсутствуют. В связи с этим целью настоящей работы являлось выделение препарата ЛПС *M. ostreistagni* EG26S8QL и характеристика его биополимерного состава.

Бактерии культивировали на среде SG [2] до окончания экспоненциальной фазы роста, осаждали клетки центрифугированием, ресуспендировали в 0,15 М NaCl и отмывали капсулу с поверхности клеток. Клетки высушивали ацетоном и измельчали. Выход сухой биомассы *M. ostreistagni* EG26S8QL составил 0,84 г/л. Экстракцию ЛПС из бактериальных клеток проводили модифицированным водно-фенольным методом Вестфала без разделения фаз [3]. Выход ЛПС составил 5,8% от массы высушенных ацетоном клеток.

Электрофоретический анализ ЛПС в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием нитратом серебра после периодатного окисления показал преобладание в ЛПС S-форм молекул, в составе которых представлен липид А (гидрофобный домен), коровый олигосахарид и О-специфический полисахарид (ОПС). Исследование биополимерного состава показало наличие всех характерных для ЛПС компонентов: углеводов (90%), в том числе 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (Кдо; 0,3%), и остатков фосфорной кислоты (1,5%). Методом ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот в составе выделенного ЛПС исследуемого штамма показано наличие 3-гидроксидекановой, 3-гидроксидодекановой, тетрадекановой, гексадекановой, цис-9-гексадеценовой, октадекановой и цис-9-октадеценовой кислот. ГЖХ ацетатов полиолов продемонстрировал преобладание глюкозы (97,4%).

Исследуемый ЛПС был подвергнут мягкой кислотной деградации с последующей гель-фильтрацией водорастворимой углеводной части. В результате была получена фракция ОПС, выход которой составил около 60% от массы ЛПС, что согласуется с результатами электрофоретического разделения и свидетельствует о высокой степени замещения корового олигосахарида ОПС. Таким образом, показана перспективность штамма *M. ostreistagni* EG26S8QL для проведения дальнейших исследований структуры ОПС.

1. Ибрахим и др. (2018) *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер.* 18(3): 345–353.
2. Sehgal et al. (1960) *Can. J. Microbiol.* 6(2): 165–169.
3. Westphal et al. (1965) *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 83–91.

АНАЛИЗ КУКУРУЗЫ САРАТОВСКОЙ СЕЛЕКЦИИ НА НАЛИЧИЕ МАРКЕРНЫХ ГЕНОВ

Ульянов А.В.¹, Волохина И.В.², Юдакова О.И.², Чумаков М.И.¹

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
ulianova.v@gmail.com

Генная инженерия растений открыла перед человечеством множество перспектив. При помощи нее можно получить генетически модифицированные (ГМ) растения с ценными сельскохозяйственными признаками, использовать ГМ-растения как биореакторы фармацевтически ценных белков, а также для изучения функционирования генов. В настоящее время генетическая трансформация является одним из наиболее широко используемых методов генной инженерии растений. Трансформация осуществляется при помощи природных векторов агробактерий, в частности *Agrobacterium tumefaciens*, используемых для переноса генов. Крупномасштабное промышленное производство генно-модифицированных (ГМ) растений, в частности кукурузы, началось в 1996 году. Россия – одна из стран, в которых было запрещено (с 1996 г. по настоящее время) коммерческое выращивание ГМ-культур. Однако с 3 июля 2016 года было подписано постановление №858 «О внесении изменений в отдельные законодательные акты РФ в части совершенствования в области генно-инженерной деятельности», которое впервые разрешает выращивание и тестирование ГМ-растений при проведении научных исследований и экспериментов [1]. С 2018 г. данный закон вступил в силу, поэтому в настоящее время стало актуально изучить исходную коллекцию местных сортов кукурузы на возможный перенос с пыльцой при возможном совместном выращивании ГМ-растений и сорта кукурузы зарубежной селекции на наличие трансформационных событий, поскольку при дальнейшей селекции местных сортов могут использоваться сорта зарубежного происхождения, которые могли быть генетически модифицированы. Одним из методов, используемых для идентификации ГМ-растений, является метод ПЦР. В данной работе представлены результаты ПЦР-анализа 17 линий кукурузы селекции Российского научно-исследовательского и проектно-технического института сорго и кукурузы (Саратов), а также 7 линий зарубежной селекции. Образцы ДНК, выделенные из листьев двухнедельных проростков кукурузы, тестировались с помощью подобранных специфических праймеров методом ПЦР на наличие генов и последовательностей, наиболее часто используемых в работах по генетической инженерии растений: *bar*, *nptII*, *Cry*, а также *p35S*, *pNos* и *tNos*. В результате исследования в образцах ДНК, полученных из трех линий американской селекции, был выявлен ПЦР-продукт гена *Cry*, кодирующий токсин, который кристаллизуется в пищеварительном тракте личинок насекомых (жесткокрылых и чешуекрылых) [2], и в одной линии детектировалась последовательность *tNos*, что свидетельствует о наличии трансформационных событий в испытанных образцах зарубежной селекции.

1. Коробко и др. (2016) *Acta Naturae*. 8(4): 6–15.
2. Bradley et al. (1995) *J. Invertebr. Pathol.* 65: 162–173.

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КУКУРУЗЫ ИЗ ЗРЕЛЫХ И НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ В ЦЕЛЯХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЯХ

Фадеев В.В., Волохина И.В., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
vvf2593@gmail.com

В генетических технологиях чаще всего используют 10-11-дневные незрелые зародыши кукурузы, поскольку они имеют меньшее количество дифференцированных клеток, в отличие от зрелых зародышей, и обладают большей способностью к образованию эмбриогенного каллуса. С полученными из незрелых зародышей каллусами проводят различные генетические манипуляции, такие как: баллистическая трансформация каллусов, трансформация каллусов с использованием *Agrobacterium tumefaciens* [1], микроинъекции в каллус [2, 3]. С каллусами, полученными из зрелых зародышей, проводят гораздо меньше генетических манипуляций, например, используют для получения кустистых растений кукурузы [4]. После проведения генетических манипуляций с каллусами, появляется проблема с регенерацией из каллуса во взрослое растение. Для запуска регенерации обычно используют добавление гормонов и изменение состава питательной среды. В данном докладе представлена оптимизация получения каллусов и регенерации кукурузы линии КМ из зрелых и незрелых зародышей. Ранее для кукурузы линии КМ не проводилось экспериментов с получением каллусов и дальнейшей регенерацией во взрослое растение. В экспериментах были использованы 10-11-дневные незрелые зародыши, а также зрелые зародыши кукурузы линии КМ, которые после выделения подвергались агробактериальной трансформации суспензионной культурой *A. tumefaciens*. Был проведён подбор состава питательных сред, для получения культуры эмбриогенного каллуса из зародышей кукурузы линии КМ. Так же был проведён подбор питательных сред для регенерации как каллусной культуры, так отдельных зародышей кукурузы линии КМ в полностью сформированное растение.

1. O'Kennedy. (2011) *Methods. Mol. Biol.* 710: 343–354.
2. Neuhaus *et al.* (1987) *Theor. and Appl. Genet.* 75: 30–36.
3. Пастернак. (1991) *Biopolymers and Cell.* 110: 20–26.
4. Хумуд. (2018) *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер.* 18: 320–324.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АГРОБАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЕМ В РАМКАХ CRISPR/CAS-ТЕХНОЛОГИИ: ПРОБЛЕМЫ, ПРИМЕНЕНИЕ

Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
chumakov_m@ibppm.ru

В докладе представлены литературные и собственные данные по методу геномного редактирования (CRISPR/Cas9) и его применению на растениях, в частности на кукурузе. Рассмотрены принципы и история развития CRISPR/Cas9-технологии. Представлены биоинформационные ресурсы, необходимые для работы этим методом, преимущества и ограничения этого метода. Рассмотрены принципы создания и методы переноса CRISPR/Cas9 векторов в растения, в частности, методу и проблемам доставки CRISPR/Cas9 векторов в однодольные растения с помощью агробактериальной трансформации.

Во второй части доклада представлены собственные экспериментальные данные по CRISPR/Cas9-редактированию растений, на примере генов, контролирующих взаимодействие гамет и развитию зародыша и эндосперма кукурузы. В частности, редактирование генов, впервые описанных в лаборатории биоинженерии ИБФРМ РАН (*Zm_gex2* (gamete expressed-2) и *ZM_hap2/gsc1* (generative cell specific-1) [1].

1. Моисеева и др. (2017) *Онтогенез*. 2: 134–139.

**Адаптация микроорганизмов и растений
к действию биотических и абиотических
факторов окружающей среды**

RPOS-НЕЗАВИСИМАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ФИТОПАТОГЕНА *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043

Александрова К.Д., Петрова О.Е., Горшков В.Ю., Гоголев Ю.В.

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

alexenia15@gmail.com

Микроорганизмы обладают мощным адаптивным потенциалом, который выражается разнообразными стрессовыми реакциями, повышающими устойчивость клеток к неблагоприятным факторам. Бактерии могут использовать одну из нескольких потенциально возможных стратегий адаптации в зависимости от типа стрессора и физиологических особенностей популяции [1]. Глобальным регулятором адаптивных реакций бактерий считается альтернативный сигма фактор RpoS. Этот белок контролирует экспрессию множества генов, продукты которых определяют резистентность бактерий к различным стрессорам [2]. Кроме того, RpoS является ключевым регулятором, индуцирующим формирование перекрестной устойчивости, которая формируется при действии первичного стрессора и выражается в приобретении клетками резистентности к множеству стрессовых факторов. Однако относительно недавно были описаны особые адаптивные реакции бактерий, которые не зависят от действия RpoS, но приводят к формированию перекрестной устойчивости [3, 4]. В то же время растущая резистентность микроорганизмов к различным стрессорам, в том числе к антимикробным агентам, становится все более актуальной проблемой с точки зрения как фундаментальных, так и прикладных аспектов современной науки. Ранее на примере пектолитических фитопатогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* продемонстрировано, что они способны реализовывать разные типы адаптивных реакций в зависимости от плотности популяции и исходного физиологического состояния в момент стрессового воздействия. Однако неизвестно, реализуются ли эти реакции RpoS-зависимым или RpoS-независимым способом.

Мы выявили, что индукция экспрессии гена *rpoS* *P. atrosepticum* зависит от лимитирующего макроэлемента в условиях голодания: при инкубировании бактерий на среде, не содержащей углерода, уровень транскриптов этого гена увеличивается, а на безазотной среде – нет. Кроме того, отсутствие гена *rpoS* не влияет на жизнеспособность клеток *P. atrosepticum* при углеродном и азотном голодании и, следовательно, формирование устойчивости к голоду происходит по RpoS-независимому механизму. В зависимости от лимитирующего макроэлемента в среде, а также от типа вторичного стрессового фактора бактерии *P. atrosepticum* формируют разные типы перекрестной устойчивости. Голодающие по углероду бактерии формируют RpoS-зависимую устойчивость к температурному шоку и окислительному стрессу, а голодающие по азоту как RpoS-зависимую к окислительному стрессу, так и RpoS-независимую к повышенной температуре. Таким образом, глобальный стрессовый регулятор RpoS не всегда является обязательным компонентом стрессового ответа у бактерий, а формирование множественной устойчивости, по-видимому, может контролироваться другими регуляторными факторами.

1. Petrova *et al.* (2016) *Microbiol. Res.* 165: 119–127.
2. Battesti *et al.* (2011) *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 189–213.
3. Wilson *et al.* (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5408–5416.
4. Gayan *et al.* (2017) *Sci. Rep.* 7: 8600.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства сельского хозяйства и продовольствия республики Татарстан

ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА КАК МАТРИЦА В ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЯХ МИКРОБИОМА

Андронов Е.Е., Иголкина А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Россия, Санкт-Петербург
eeandr@gmail.com

Со времени, когда Бейеринк (Баас Бекинг) сформулировали «Everything is everywhere...», прошло почти 100 лет. С тех пор было проведено множество исследований того, как окружающая среда формирует микробиомы, продемонстрировавших с разной степенью ясности связи между факторами окружающей среды и таксономической/функциональной структурой природных микробиомов. Однако существует система, в которой как факторы окружающей среды, так и гены, ответственные за взаимодействие с этими факторами, четко определены. Эта система называется бобово-ризобиальным симбиозом, который также связан с именем Бейеринка, потому что он был не только первым ученым, который выделил бактерии из корневого клубенька, но на самом деле был автором их названия «ризобии». Примечательной особенностью этого симбиоза является то, что растение играет роль среды обитания для ризобий, и генетический контроль некоторых «факторов окружающей среды» и микробных генов, ответственных за взаимодействие с «средой», хорошо известен. На данных, полученных из глубоко секвенированных библиотек генов растений и ризобиальных симбиотиков, мы покажем, что существует тесная связь между генетическими структурами различных популяций растений-хозяев бобовых и популяциями ризобий, которые они содержат. Они в буквальном смысле «отражают» друг друга не только с точки зрения нуклеотидного разнообразия, но и топологически: филогенетическое древо почвенной популяции ризобий топологически трансформируется при переходе от почвы к растению, становясь сходным с деревом растения-рецептора. Для описания последнего эффекта мы вводим новый тип разнообразия «топологическое β -разнообразие». Весь процесс был обозначен как «экологический / эволюционный прессформинг», где среда и микробиом играют роль жесткой пресс-формы и формируемого вещества. Приведенные данные свидетельствуют о том, что симбиоз является экстремальной моделью микробной экологии [1, 2].

1. Igolkina *et al.* (2018) *Front. Plant. Sci.* 9: 334.
2. Igolkina *et al.* (2019) *Ecology and Evolution*. (in press).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 18-16-00073

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПЕРОКСИДАЗА *Fusarium oxysporum* Schltdl

Баландина С.А., Позднякова Н.Н., Гринев В.С., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
sveta.balandinp@mail.ru

Аскомицеты рода *Fusarium* широко распространены в природе. Большинство видов и штаммов этого рода являются сапротрофами, использующими лигнин, сложные углеводы и растительный опад в качестве источника углерода. Некоторые представители *Fusarium* известны как деструкторы опасных поллютантов, включая нефть [1] и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [2]. Деградационную активность высших грибов по отношению к поллютантам связывают с продукцией ими внеклеточных неспецифических ферментов: лакказ и пероксидаз. В отличие от ферментов базидиомицетов, работ, посвященных выделению и характеристике подобных ферментов из аскомицетов немного [3, 4].

Ранее нами было показано, что в ответ на присутствие в среде культивирования ПАУ или нефти *Fusarium oxysporum* Schltdl. продуцировал внеклеточную пероксидазу [5]. По-видимому, этот фермент является необходимым для их деградации грибом. Для проверки этого предположения необходимы были очистка и изучение каталитических свойств пероксидазы.

В представленном исследовании пероксидаза была выделена и частично охарактеризована. Были подобраны условия культивирования гриба, позволяющие получить фермент в количествах, необходимых для дальнейших исследований. Разработанная нами схема очистки включала фракционирование сульфатом аммония и три типа хроматографии (ионообменную, гель-фильтрацию и гидрофобную). В результате очистки было получено около 112 мкг пероксидазы. Выход по активности составил 6,2%.

Молекулярная масса пероксидазы составляла 86 кДа. Показано, что фермент проявлял каталитическую активность только в присутствии H_2O_2 и окислял фенольные (пирокатехин, гваякол, 2,6-диметоксифенол) и нефенольные (АБТС, 2,7-диаминофлуорен, *o*-дианизидин) субстраты. Обнаружено, что, за исключением гваякола, оптимумы pH окисления этих субстратов находятся в кислой области, что является характерным для грибных пероксидаз. Наименьшее значение pH – 2,5 было показано для окисления АБТС.

Показано, что наибольшим сродством фермент также обладал к АБТС, соответственно величина K_m (0,017 мМ) для этого субстрата была самой низкой. Тогда как число оборотов ($32,2\text{ с}^{-1}$) было наибольшим для H_2O_2 . Обнаружено, что пероксидаза в значительной степени (в 4,5 раза) стимулировалась Mn^{2+} . Фермент окислял как нативные ПАУ (флуорен, флуорантен, фенантрен), так и продукт окисления флуорена – 9-флуоренон. Использование ВЭЖХ позволило идентифицировать продукты окисления фенантрена – 9,10-фенантренин и флуорена – 9-флуоренон.

Полученные данные позволяют предположить, что пероксидаза *F. oxysporum* по каталитическим свойствам может быть подобной Mn-зависимым пероксидазам лигнинолитических базидиомицетов. Способность этого фермента катализировать окисление нативных ПАУ подтверждает его участие в начальной атаке этих соединений.

1. Fariba *et al.* (2010) *Ecotoxicol. Environ. Safety* 73: 613–619.
2. Jacques *et al.* (2008) *Bioresour. Technol.* 99: 2637–2643.
3. Obruca *et al.* (2012) *Folia Microbiol.* 57: 221–227.
4. Huy *et al.* (2017) *Microbiol.* 41: 52–56.
5. Pozdnyakova *et al.* (2018) *Int. Microbiol.* doi.org/10.1007/s10123-018-0032-z.

Работа выполнена по теме № 0127-2018-0005 (руководитель д.б.н., проф. О.В. Турковская) и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-00351

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ АЦК ДЕЗАМИНАЗЫ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССАМ

Белимов А.А.¹, Шапошников А.И.¹, Зиновкина Н.Ю.¹, Сафронова В.И.¹, Dodd I.C.²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Россия, Санкт-Петербург

² Lancaster Environment Centre, Lancaster University, Lancaster, United Kingdom
belimov@rambler.ru

В докладе представлены литературные данные и оригинальные результаты изучения симбиотрофных бактерий, содержащих фермент 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазу, благодаря которому бактерии снижают образование фитогормона этилена и стимулируют рост растений. Аминокислота АЦК является непосредственным предшественником в биосинтезе фитогормона этилена, который вовлечен во многие звенья процессов роста и развития растений, включая прорастание семян, инициацию и удлинение тканей и органов, цветение, созревание плодов, старение тканей и реакции на стрессовые факторы. Активизация биосинтеза АЦК и этилена является неспецифической реакцией растений на различные стрессы, а в стрессовых условиях этилен действует как негативный регулятор ростовых процессов. АЦК является также компонентом корневых экссудатов, которые служат одним из основных субстратов для ризосферных бактерий. Благодаря АЦК-дезаминазной активности многие ризобактерии обеспечивают себя азотом и углеродом, расщепляя эту аминокислоту на α -кетобутират и аммоний. Обсуждаются механизмы действия АЦК-утилизирующих бактерий на растения, биоразнообразие АЦК-утилизирующих бактерий, а также характеристика фермента и гена АЦК дезаминазы. Особое внимание уделено роли данного растительно-микробного взаимодействия в устойчивости растений к биотическим (поражение растений фитопатогенными бактериями) и абиотическим стрессам (засуха, засоление, загрязнение почвы тяжелыми металлами), а также в образовании бобово-ризобияльного симбиоза в неблагоприятных почвенно-климатических условиях. В частности, показано, что штамм *Pseudomonas brassicacearum* Am3 маскирует свои фитопатогенные свойства благодаря снижению защитных реакций томатов (*Solanum lycopersicum* L.) на инокуляцию. Рост-стимулирующие ризобактерии *Pseudomonas oryzae* и *Variovorax paradoxus* утилизируют выделяемую корнями томатов АЦК и стимулируют рост растений при недостатке влаги. Инокуляция гороха (*Pisum sativum* L.) диким типом штамма *Variovorax paradoxus*, но не его мутантом по АЦК дезаминазе, также повышала устойчивость гороха к засухе и положительно влияла на водное питание и азотфиксирующий симбиоз. Важная роль АЦК дезаминазы в образовании и функционировании бобово-ризобияльного симбиоза показана и для клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*.

Работа поддержана грантами РФФИ (14-16-00137, 19-16-00097)
и РФФИ (09-04-01614, 12-04-01501)

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ИНФИЦИРОВАННОСТИ *Helicobacter pylori* ПРИ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ У РАБОТНИКОВ АТОМНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Васина М.А., Сокольникова С.С., Поволоцкая С.В., Рабинович Е.И.

Южно-уральский институт биофизики, Россия, Озерск

mashaevd@mail.ru

Инфекция *Helicobacter pylori* – один из ведущих факторов риска развития заболеваний гастродуоденальной зоны. Практически во всех случаях инфицирования *H. pylori* развивается хронический гастрит (ХГ), протекающий в большинстве случаев бессимптомно. Как известно, возможны различные клинические варианты течения *H. pylori* – ассоциированной патологии, что зависит от особенностей взаимодействия микроорганизма с кислотопродуцирующими, цитопротективными и иммунологическими компонентами слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта инфицированного организма. Так, в 30–40% случаев ХГ трансформируется в атрофический гастрит (АГ), в 8–12% развивается язвенная болезнь (ЯБ) желудка и/или 12-перстной кишки, в 1–3% – рак желудка [1]. *H. pylori* рассматривается в качестве канцерогена первого порядка, имеющего безусловную связь с возникновением рака желудка [2]. По результатам изучения показателей заболеваемости и смертности среди персонала предприятия атомной промышленности, Производственного объединения (ПО) «Маяк», рак желудка (РЖ) занимает 3–4 ранговые места в структуре злокачественных новообразований среди мужчин и женщин соответственно [3]. Это свидетельствует о необходимости эффективной канцеропревенции, включающей эрадикацию *H. pylori*.

Показатели распространенности и выраженности хеликобактерной инфекции исследовали у работников ПО «Маяк» с диагностированной ЯБ желудка или 12-перстной кишки (100 чел) (данные анамнеза) и АГ (101 чел) (данные обследования с помощью серологической технологии «Гастропанель»). Наличие инфицированности микроорганизмом оценивали по уровню IgG-антител к *H. pylori*. Среди больных ЯБ в 94% случаев был выявлен хеликобактериоз (по собственным и анамнестическим данным), доля пролеченных составила 60% (57 человек), однако успешной эрадикация оказалась в 2/3 случаев. В изученной группе лиц с диагнозом АГ 68 % были носителями микроорганизма, при этом эрадикация была проведена только 3-м пациентам, что свидетельствует о недооценке патогенетической роли *H. pylori* в развитии АГ. Средние уровни IgG-антител к *H. pylori* составили для антителоопозитивных лиц – $90,03 \pm 2,56$ ИФЕ и $91,63 \pm 2,70$ ИФЕ с диагнозом ЯБ и АГ соответственно. Таким образом, на момент проведения исследования выявлено, что хеликобактерная обсемененность работников ПО «Маяк» с гастродуоденальной патологией составляет около 70% без существенных различий в выраженности антителообразования в зависимости от нозологической формы заболевания. Согласно стратегических положений, определенных международными согласительными документами [4], эти пациенты (142 человека) нуждаются в проведении курса эрадикационной терапии с учетом особенностей персистенции микроорганизма: топография процесса, наличия гипер- или гипосекреторного симптомокомплекса, предшествующего лечения и других факторов взаимодействия *H. pylori* со средой обитания.

1. Герман и др. (2014) *Гигиена и санитария*. 6: 76–78.
2. Баранская и др. (2002) *РЖГТК*. 3: 1–14.
3. Кошурникова и др. (2006) *Медицина экстремальных ситуаций*. 4(18): 30–40.
4. Malfethertheiner et al. (2012) *Gut*. 61(7): 646–664.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СЕЛЕНИТА БАКТЕРИЯМИ *Azospirillum brasilense* Sp245 И Sp7 В ПРИСУТСТВИИ СУЛЬФАТА

Владимирова А.А., Мамченкова П.В., Камнев А.А., Тугарова А.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
vladimirova-nastyusha@bk.ru

Уже не одно десятилетие феномен образования наночастиц микроорганизмами вызывает огромный научный интерес. «Зеленый» синтез наночастиц является безопасной и экологически чистой альтернативой физико-химическим методам. В нашей лаборатории была показана способность бактерий рода *Azospirillum* восстанавливать селенит-ионы с образованием наночастиц элементарного селена [1]. В последнее время возрос интерес к изучению наночастиц смешанного состава, что обусловлено их уникальными свойствами, не характерными для монокомпонентных наночастиц. Так, в недавней статье Фогель с соавт. [2] продемонстрирована возможность образования смешанных Se–S-содержащих наночастиц бактерией *Azospirillum brasilense*, что привлекло наше внимание.

Целью данной работы было исследование восстановления селенита натрия бактериями *A. brasilense* и возможности образования наночастиц смешанного состава в присутствии повышенной концентрации Na_2SO_4 . Объектами исследования явились штаммы *A. brasilense* Sp245 и Sp7. Для достижения поставленной цели исследуемые штаммы выращивали в присутствии 1 г/л Na_2SO_4 и 1 мМ селенита натрия в течение 7 сут. По окончании времени культивирования клетки, выращенные в присутствии Na_2SO_4 и селенита натрия, а также выделенные наночастицы были исследованы с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и спектроскопии комбинационного рассеяния (СКР).

С помощью ПЭМ показано наличие в бактериальных суспензиях *A. brasilense* Sp245 и Sp7 электроноплотных включений сферической формы, локализованных преимущественно экстраклеточно. На микрофотографиях ПЭМ выделенных наночастиц присутствовали сферические, достаточно однородные по размеру частицы. По результатам СКР было показано, что выращивание клеток штаммов в присутствии селенита натрия и Na_2SO_4 приводит к появлению в спектрах биомассы пиков при 250 см^{-1} , что соответствует селену в аморфной модификации [3], и при $348\text{--}346\text{ см}^{-1}$, что соответствует связи Se–S [2] в молекулах, содержащих оба элемента. При этом на спектрах КР образцов наночастиц, отделенных от биомассы клеток, наблюдался лишь один пик, соответствующий аморфному селену. Последнее указывает на то, что в данном случае сера не входит в состав наночастиц. В контроле, представляющем собой клетки, выращенные с Na_2SO_4 , но в отсутствие селенита натрия, никаких пиков в указанной области не наблюдалось. Полученные результаты отличаются от данных, представленных в работе Фогель с соавт. [2], что может быть связано с различиями как в условиях культивирования, так и в методике выделения наночастиц. Мы не исключаем наличия сопряженного с восстановлением селенита процесса восстановления сульфата, приводящего к образованию смешанного осадка Se–S (но не в виде наночастиц). Выявленный факт требует дальнейшего изучения.

Таким образом, нами было исследовано восстановление селенита в присутствии SO_4^{2-} бактериями *A. brasilense* Sp245 и Sp7. Процессы восстановления оксоанионов селена микроорганизмами важны с точки зрения возможностей их применения в биоремедиации, биотехнологии и других областях. Дальнейшие исследования как фундаментальных, так и прикладных аспектов восстановления оксоанионов селена, в частности, с участием азоспирилл представляют несомненный интерес.

1. Tugarova et al. (2014) *Microb. Ecol.* 68: 495–503.
2. Vogel et al. (2018) *J. Hazard. Mater.* 344: 749–757.
3. Tugarova et al. (2018) *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 192: 458–463.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ И СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ НА СИГНАЛИНГ И АКТИВНОСТЬ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ В БИОПЛЕНКАХ ФИТОПАТОГЕНОВ И МУТУАЛИСТОВ РАСТЕНИЙ

Гончарова А.М., Ломоватская Л.А., Романенко А.С.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Иркутского научного центра РАН,
Россия, Иркутск
alvlad87@mail.ru

В процессе жизнедеятельности бобовые секретируют в почву широкий спектр фенольных соединений, обладающих свойствами аллеллопатических или сигнальных молекул и способны оказывать эффект на рост бактериальных культур. Мажорным компонентом экссудатов гороха является аллеллопатическое соединение N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА), а нарингенин, также компонент корневых выделений, является сигнальной молекулой, необходимой для становления бобово-ризобияльного симбиоза.

Известно, что основной формой существования бактерий являются биопленки [1]. Активность некоторых факторов вирулентности бактерий в биопленках зависит от ряда факторов, в том числе от вторичных посредников сигнальных систем. В частности, важную регуляторную роль играет цАМФ, вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы (АСС) [2].

Исходя из этого, целью нашей работы было изучить влияние N-ФНА и Naг на биопленкообразование, активность компонентов АСС и факторов вирулентности *Rhl* и патогена гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*).

Результаты показали, что 9 мкМ N-ФНА снижал плотность биопленок *Rhl* и *Psp* примерно в равной степени. При этом, уровень цАМФ у обеих бактерий снижался за счет наиболее интенсивного возрастания активности рФДЭ по сравнению с рАЦ. Активность тМАЦ и тмФДЭ практически не менялись. Известно, что в число основных факторов вирулентности фитопатогенов и мутуалистов входят пектиназы и целлюлаза, разрушающие клеточные стенки растений. В присутствии N-ФНА активность этих ферментов у *Psp* практически не изменялась, в то время как в клетках *Rhl* незначительно снижалась.

Так как в литературе нет однозначных сведений о концентрации нарингенина в корневых экссудатах бобовых, нами был взят широкий спектр концентраций данного соединения: 500 пМ, 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ, 1 мкМ. Интересно, что при действии 500 пМ Naг наблюдалось увеличение плотности биопленок *Rhl* и снижение данного показателя у *Psp*. При этом наблюдалось возрастание уровня цАМФ у обоих видов бактерий за счет наибольшей активации рАЦ по сравнению с рФДЭ. Активность целлюлазы в присутствии Naг возрастала только у *Rhl*, в то время как у *Psp* практически не менялась. Вероятно, это связано с необходимостью данного фермента у *Rhl* на этапе проникновения в корневые волоски, в то время как *Psp* инфицирует горох через устьица и, следовательно, не нуждается в деградации клеточной стенки на стадии заражения.

1. Гостев и др. (2014) *Журнал инфектологии*. 2(3): 4–15.
2. Fuqua et al. (2001) *Annual review of genetics*. 35(1): 439–468.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-34-00295-мол_a

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЗАЦИИ МИКРОРАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Денисова А.Ю.¹, Евсеева Н.В.², Ткаченко О.В.¹, Бурыгин Г.Л.^{1,2}

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
alena.denisova1408@yandex.ru

Стресс, вызванный засухой, является одним из самых разрушительных абиотических факторов, отрицательно влияющих на рост и урожайность культурных растений. Поэтому поиск путей повышения устойчивости растений к засухе является крайне важным и актуальным. Недавние исследования показали, что микробная инокуляция PGPR-бактериями может смягчать стресс у растений [2]. Бактерии снабжают их дополнительными минеральными, органическими веществами, фитогормонами, доступным азотом, влияют на содержание пролина [1].

Целью работы было исследование взаимодействия микроклонов картофеля с ростстимулирующими бактериями *Azospirillum brasillense* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 при осмотическом стрессе в условиях *in vitro*. В экспериментах были использованы микрорастения картофеля сорта Невский. В качестве инокулянтов использовали два штамма бактерий – *A. brasillense* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2. Микрочеренки растений культивировали в жидкой питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) без гормонов. На 10 сутки в питательную среду добавляли суспензию бактерий в концентрации 10^6 кл/мл. После 5 суток инокуляции среда с бактериями была заменена на питательную среду (MS) с полиэтиленгликолем в концентрации 25 г/л. Через 7 суток среда с ПЭГ была заменена на стандартную питательную среду (MS) для исследования процессов репарации. Оценку состояния растений проводили на основании изменения морфофизиологических и биохимических параметров микрорастений.

В результате исследований было установлено, что исследуемые бактерии положительно влияли на физиолого-биохимические параметры микроклонов картофеля, достоверно увеличивая длину побега и количество корней. В условиях осмотического стресса бактериализация способствовала смягчению действия стресса, что проявлялось в снижении уровня МДА в листьях, как продукта перекисного окисления липидов в растительных клетках, и приводило к ускорению репарационных процессов. Следует заметить, что штамм *O. cytisi* IPA7.2, выделенный нами из ризосферы картофеля, сильнее проявлял протекторные действия на физиолого-биохимические процессы в растениях при стрессе и репарации по сравнению с азоспириллами. Бактерии *A. brasillense* Sp245 хуже переносили действие стресса, что приводило к ослаблению их защитных функций. Полученные данные позволяют предположить, что исследуемые бактерии могут быть использованы в составе биоудобрений. Причем штамм *A. brasillense* Sp245 лучше использовать в широтах с умеренным климатом, а бактерии *O. cytisi* IPA7.2 могут быть с успехом использованы в суровых условиях засоления и засухи. Развитие работ в данном направлении может способствовать повышению адаптационного потенциала растений против стрессовых факторов в целенаправленно создаваемых растительно-микробных ассоциациях, что представляется перспективным с точки зрения общих подходов к экологически чистому земледелию.

1. Pii *et al.* (2015) Biol. Fertil Soils. 51(4):403–415.

2. Tkachenko *et al.* (2018) Annu. Wheat Newsllett. 64: 37–39.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 19-016-00116

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ «СОЦИУМ» БИОПЛЕНОК ИЛИ ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ РИЗОСФЕРЫ

Евстигнеева С.С., Федоненко Ю.П.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
stels20295@yandex.ru

В природной среде обитания подавляющее большинство бактерий (95-99%) формируют биопленки, представляющие собой непрерывный сформированный на границе раздела фаз мультислой клеток, погруженных во внеклеточный полимерный матрикс [1]. Подобная трактовка не полностью отражает суть феномена объединения бактериальных клеток в единое обособленное сообщество. Каждая биопленка, образованная ли одним, или сотнями видов бактерий, уникальна. Она развивается и существует по определенным законам, подчас напоминающим законы современного социума. Именно поэтому при описании организации и функционирования биопленок используют их сравнение с густонаселенными и процветающими «мегаполисами» [2]. «Социальное» поведение бактерий выражается в их постоянном стремлении к получению, переработке и передаче информации об окружающем мире своим «соседям» через различные каналы связи. Это могут быть межклеточная контактная коммуникация для передачи сигналов «ближнему», а также химическая дистантная коммуникация, осуществляемая посредством продукции ауторегуляторов, для подачи сигналов клеткам «другого района микробного города». Развитые транспортные системы, формируемые биополимерами матрикса, позволяют без труда поставлять бактериям питательные вещества и воду, а также регулировать отток продуктов распада. Однако главное сходство биопленок с настоящими городами кроется в наличии иерархической системы «населения», благодаря которой каждый «житель» бактериального сообщества точно знает свою задачу и безошибочно ее выполняет для процветания «мегаполиса» [3].

Ризосфера – наиболее заселенный микроорганизмами участок почвы, в котором реализуются различного рода взаимодействия между корневой системой растений и бактериями. Среди непатогенной микрофлоры выделяют ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений, а также защищающие их от вредителей и фитопатогенов. При заселении поверхности или внутренних тканей корней данные бактерии формируют мультивидовые «густонаселенные» биопленки. В образовании подобных сообществ задействовано огромное разнообразие микробных и растительных метаболитов, которые запускают целый каскад реакций: начиная от первичного контакта бактерий с клетками корней и заканчивая централизованным транспортом флавоноидов по бактериальному матриксу. Растение, в таком случае, выступает для бактерий как территория, богатая «полезными ископаемыми», которую необходимо заселить, освоить, но и не забывать заботиться, чтобы не истощить запасы и сохранять баланс. Понимание ключевых механизмов формирования «микробных городов» на корнях растений является важной задачей для полноценного внедрения экологически безопасных бактериальных удобрений. Применение таких биопрепаратов сможет существенно повысить урожайность важных злаковых культур не только в пределах отечественного агрокомплекса, но и за рубежом.

В докладе будут представлены данные об особенностях организации и жизнедеятельности биопленок на примере наиболее значимых для сельского хозяйства бактерий родов *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и др. Будут рассмотрены экологические аспекты «микробного сотрудничества» в биопленках, а также возможности их дальнейшего практического применения.

1. Смирнова и соавт. (2010) *Микробиология*. 79 (4): 435–446.
2. Николаев и соавт. (2007) *Микробиология*. 76 (2): 149–163.
3. Олескин. (2009) *Журнал общей биологии*. 70 (3): 225–238.

Исследование поддержано грантом РФФИ (проект 18-34-00089)

УЛЬТРАСТРУКТУРА БИОПЛЕНОК ТИПОВОГО ШТАММА *Azospirillum brasilense* SP7 И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ СО СПОНТАННЫМИ ГЕНОМНЫМИ ПЕРЕСТРОЙКАМИ

Мокеев Д.И., Петрова Л.П., Шелудько А.В., Кацы Е.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
mokeev.d.93@mail.ru

Azospirillum brasilense – почвенные бактерии, вступающие в продуктивные ассоциативные отношения с разнообразными культурными растениями [1]. Определенное значение для успешного функционирования растительно-микробной ассоциации может иметь способность азоспирилл формировать биопленки на поверхности подземных органов растения-хозяина. Формирование биоплёнок на поверхности корней растений имеет крайне важное адаптационное значение для эпифитных и эндофитных ризобактерий. Клетки бактерий в биопленках также характеризуются морфологическим и функциональным разнообразием. Морфологический и функциональный полиморфизм клеточных форм в биопленках азоспирилл практически не охарактеризован, хотя типичен для вегетативных клеток этих бактерий, выросших в жидких или на плотных средах [2, 3]. Так, покоящиеся формы повышают устойчивость бактериальной популяции к различным негативным воздействиям, как нагревание и высушивание, окислительный стресс и др., в том числе, и в случае азоспирилл [4, 5]. Таким образом, характеристика клеточных форм в биопленках необходима для понимания механизмов формирования и функционирования бактериальных пленок, их устойчивости к внешним воздействиям, подбора способов управления данными процессами в экологических и биотехнологических целях.

В данном докладе представлено исследование полиморфизма клеточных форм в биоплёнках штаммов *A. brasilense* Sp7, Sp7.4, Sp7.8 и Cd, и дана характеристика покоящихся форм в этой разновидности бактериальной популяции. В задачи исследования входили анализ ультраструктуры биопленок, сформированных на средах со связанным азотом и без него (условия, способствующие фиксации азоспириллами атмосферного азота), характеристика устойчивости биопленочных популяций к высушиванию и окислительному стрессу. Ранее для данных штаммов не проводилось исследований ультраструктуры бактерий в составе биоплёнок. Были выявлены общие черты ультраструктуры биопленок вида *A. brasilense*. Обнаружены нескольких типов одиночных и неразделившихся клеток, цистоподобные формы с выраженным морфологическим разнообразием.

1. Bashan *et al.* (2010) *Adv. Agron.* 108: 77–136.
2. Döbereiner *et al.* (1976) Symposium on nitrogen fixation. Pullman: Washington State University Press. 518–538.
3. Sadasivan *et al.* (1987) *J. Bacteriol.* 169:1670–1677.
4. Pope *et al.* (1970) *J. Bacteriol.* 102:234–239.
5. Eskew *et al.* (1977) *Appl. Environ. Microbiol.* 34:582–585.

СИСТЕМА ТОКСИН-АНТИТОКСИН В РЕГУЛЯЦИИ БИОПЛЕНОК *Mycobacterium smegmatis*

Полушкина Н.В.¹, Попова И.В.², Ерошенко Д.В.², Полудова Т.В.^{1,2}

¹ Пермский государственный аграрно-технологический университет имени академика
Д.Н. Прянишникова, Россия, Пермь

² Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный
исследовательский центр Уро РАН, Россия, Пермь
dasha.eroshenko@gmail.com

В работе изучены различные виды биопленок бактерий *Mycobacterium smegmatis* штамма mc² 155 (wild type – wt) и его мутантов с делецией локуса гена *vapBC*, гена *mazEF* и с делецией обоих указанных локусов (*vapBC*×*mazEF*) при выращивании на поверхности полистирола на среде с лактатом натрия. Двухкомпонентная система токсин-антитоксин (ТА) отвечает за регуляцию клеточных функций, например, трансляцию, репликацию, синтез компонентов клеточной стенки, за счет синтеза белка-токсина и его инактивации через связывание с антитоксином. Показано, что ТА системы (*VapBC*, *MazEF* и *Phd/Doc*), обнаруженные в геноме *M. smegmatis* отвечают за адаптацию бактерий к стрессовым факторам [1].

Для выращивания биопленок вносили по 3 мл среды с лактатом натрия в чашку Петри (диаметр 36 мм) с конечной концентрацией бактерий 10⁵ КОЕ/мл, герметизировали парафильмом и инкубировали 3 суток при 37 °С. Затем плавающую биопленку отделяли от остального содержимого чашки Петри, для этого в чашку осторожно добавляли по 8 мл 0,85% раствора NaCl, а затем к ней аккуратно переносили на крышку от чашки Петри. Клетки планктонной части отделяли от придонной биопленки центрифугированием (10000 ×g, 10 мин). Биомассу и количество живых клеток в каждой фракции определяли по интенсивности окрашивания с генцианвиолетом и МТТ, соответственно. Окрашивание МТТ (0,5 мг/мл, 2 мл) проводили 2 ч при 37 °С, затем в пробы добавляли по 2 мл лизирующего раствора (20% твин-80 на 50% этаноле) и оставляли на 16-18 ч, после чего измеряли оптическую плотность экстрактов при 570 нм.

Исследования показали, что при росте на жидкой питательной среде в статических условиях в культуре микобактерий формируются три субпопуляции: биопленка плавающая на границе жидкость/воздух; биопленка, сосредоточенная на твердой поверхности, граничащей с жидкостью; и планктонные клетки. Распределение биомассы по этим трем фракциям происходит неравномерно. Так, для всех изученных штаммов общая биомасса плавающей пленки практически в 3 раза превышала биомассу пленки, закрепленной на полистироле. Вероятно, клетки в составе плавающей биопленки наиболее активно синтезируют межклеточный матрикс. Особенно это выражено у бактерий двойного мутанта *M. smegmatis* mc² 155 Δ*vapBC*×*mazEF*. Тогда как, бактерии wt в меньшей степени продуцируют межклеточное вещество как в плавающей биопленке, так и в придонной, по сравнению с микобактериями мутантных штаммов. Обращает на себя внимание тот факт, что количество живых клеток, при окрашивании МТТ, было практически одинаково в разных типах биопленок и среди всех штаммов. Судя по биомассе и по дыхательной активности, наименьшее количество клеток (в 10-15 раз меньше биомассы плавающей биопленки) было обнаружено во фракции свободно плавающих планктонных клеток. Данная особенность была характерна для всех исследованных штаммов.

Таким образом, потеря одной из ТА систем бактериями *M. smegmatis* незначительно сказывается на способности микобактерий формировать различные типы биопленок. В то же время, мутант с делецией обоих генов был способен продуцировать межклеточный матрикс в большем количестве по сравнению со штаммом wt.

1. Demidenok et al. (2014) *FEMS Microbiol. Lett.* 352: 69–77.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 18-34-00333 мол_а

**ВЛИЯНИЕ АГРОКЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА МОРФОЛОГО-
КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЯ СЕПТОРИОЗА ПШЕНИЦЫ**
Stagonospora nodorum

Зеленева Ю.В., Судникова В.П.

Среднерусский филиал ФГБНУ ФНЦ им. И.В.Мичурина, Россия, Тамбов
tmbsnifs@mail.ru

С целью изучения влияния агроклиматических условий на структуру популяции *S. nodorum* по морфолого-культуральным свойствам нами были взяты изоляты, выделенные с сортов озимой и яровой пшеницы из трех агроклиматических зон Центрально-Черноземного региона (ЦЧР). Эти зоны географически располагаются следующим образом: северная часть правобережья реки Дон (Зона I), Окско-Донская низменность (II) и южная часть правобережья реки Дон и Калачская возвышенность (III). Данные географические зоны имеют следующие погодные особенности. В северной части правобережья Дона годовое количество осадков составляет 490-560 мм. На территории Окско-Донской низменности данный показатель находится в пределах 450-500 мм, то есть меньше, чем в зоне I. На территории Калачской возвышенности, также как в южной части правобережья Дона сумма осадков составляет 400-450 мм. Вегетационный период с устойчивыми эффективными температурами (+5°C и выше) продолжается в агроклиматических зонах I и II 175-180 дней, в зоне III – до 200 дней. В ЦЧР довольно часто случаются засухи, причем в северо-западной части их периодичность реже, чем на юге: 1 раз в 4 года на севере и 1 раз в 3 года в южной части. Почвенный покров на территории региона весьма неоднороден: в зоне I преобладают дерново-подзолистые почвы, а также оподзоленные, выщелоченные и слабовыщелоченные черноземы; в зоне II отмечаются преимущественно выщелоченные, слабовыщелоченные, типичные и обыкновенные черноземы; в зоне III – типичные, обыкновенные, маломощные, южные черноземы. Было установлено, что в популяциях *S. nodorum* из трех агроклиматических зон ЦЧР в 2009 году наблюдались большие колебания фенотипического разнообразия. Число фенотипических классов составляло: $6,42 \pm 0,407$ в зоне I (доля редких морфотипов $0,287 \pm 0,045$); в зоне II – $3,74 \pm 0,099$ (доля редких морфотипов $0,065 \pm 0,025$), в то время как в зоне III показатель был самым низким и составлял $1,00 \pm 0,099$ (доля редких морфотипов $0,5 \pm 0,05$). Таким образом, в случае с возбудителем *S. nodorum*, погодные условия каждой конкретной агроклиматической зоны ЦЧР оказывают значительное влияние на фенотипическое разнообразие популяций патогена. Определение сходства популяций *S. nodorum* проводили по критерию Животовского. При попарном сравнении всех представленных популяций были выявлены значимые различия на 5% и 1% уровне значимости (значение критерия идентичности варьировало от 64,8 до 129,4; в то время как χ^2 при m-1 степеней свободы равен 16,92 при 5% и 21,67 при 1% уровне значимости). При изучении уровня пикнидообразования на поверхности колоний *S. nodorum*, выделенных с сортов озимой и яровой пшеницы из трех агроклиматических зон ЦЧР было выявлено следующее. Колонии с малым числом пикнид на поверхности (менее 49) доминировали на сортах северной части правобережья реки Дон и Окско-Донской низменности, где их частота встречаемости составляла 92% и 75% соответственно. В то же время данный тип колоний на сортах из южной части правобережья реки Дон и Калачской возвышенности был зарегистрирован лишь в 1% случаев. Колонии со средним уровнем пикнидообразования (числом пикнид от 50 до 200) были довольно редки в изолятах из всех трех агроклиматических зон (частота встречаемости варьировала от 2% (Зона III) до 6% (Зона II)). Колонии с высоким уровнем пикнидообразования (более 200 пикнид на поверхности) доминировали в изолятах с сортов из зоны III (частота встречаемости 97%). В то время как, в изолятах из других агроклиматических зон ЦЧР были представлены менее чем в 20% случаев. Таким образом, данные популяции не принадлежат одной генеральной совокупности, что подтверждает сильное влияние агроклиматических факторов на структуру популяции *S. nodorum*.

ВЛИЯНИЕ НА ПОЧВЕННУЮ МИКРОБИОТУ ЖЕЛЕЗА, МЕДИ И НИКЕЛЯ, ВНЕСЕННЫХ В ПОЧВУ ОТДЕЛЬНО И В РАЗЛИЧНЫХ КОМБИНАЦИЯХ

Зеленова Н.А., Нзун К.Т., Плешакова Е.В.

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени
Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов
n.a.zelenova98@yandex.ru

В современном индустриализованном обществе большую угрозу для биосферы представляют тяжелые металлы (ТМ), отличающиеся токсическим действием на живые организмы, высокой персистентностью и способностью к биоаккумуляции. Значительное количество ТМ накапливается в почве, оказывая отрицательное действие на свойства почвы и почвенную биоту. Целью настоящей работы явилось изучение динамики численности почвенных микроорганизмов при загрязнении почвы (южный чернозем) железом, никелем и медью в разных концентрациях и комбинациях в ходе длительного модельного эксперимента. Оценивали общую численность гетеротрофных микроорганизмов (ОЧГМ) и численность железоокисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 0, 30 и 90 сут после внесения в почву ТМ. При выборе концентраций ТМ для Ni(II) и Cu(II) ориентировались на ПДК в почвах подвижных форм этих металлов (4,0 и 3,0 мг/кг почвы соответственно), для Fe(II) руководствовались значениями РГФ (2,3 мг/кг почвы). Почву загрязняли индивидуальными ТМ в концентрациях в 10 и 50 раз выше ПДК и РГФ, а также ТМ в этих концентрациях в различных сочетаниях. Всего было изучено 13 вариантов в нескольких повторностях. В качестве контроля использовали чистую незагрязненную почву.

ОЧГМ в почвенных микробоценозах через 30 сут после внесения в почву ТМ была сравнима с ОЧГМ в контрольной чистой почве или выше. Наиболее заметное увеличение ОЧГМ (в 2-3 раза) обнаружено в почве при загрязнении ее Fe(II) в концентрациях 10 и 50РГФ, Cu(II) в концентрации 50ПДК и комбинации Fe(II) и Cu(II) в концентрации 50ПДК. ОЧГМ в почвенных микробоценозах через 90 сут после внесения в почву ТМ была сравнима с ОЧГМ в контрольной чистой почве или ниже. Во всех вариантах было обнаружено ингибирование (в 1,6-2,5 раза) развития гетеротрофных микроорганизмов по сравнению с результатами анализа через 30 сут (за исключением варианта с внесением 50ПДК Ni(II)). Максимальное снижение ОЧГМ (в 4,7 раза) наблюдалось при загрязнении почвы полной комбинацией ТМ. Численность железоокисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах через 30 сут после внесения в почву ТМ была меньше, чем в контрольной чистой почве за исключением почвы, загрязненной 10 и 50ПДК Cu(II), в которой обнаружена стимуляция развития железоокисляющих микроорганизмов (примерно в 2 раза). Установлено, что ингибирующее действие комбинации ТМ на развитие железоокисляющих микроорганизмов в почве через 30 сут после загрязнения было сильнее, чем действие индивидуальных металлов. Значительное подавление роста железоокисляющих микроорганизмов (в 17,6 раза) обнаружено в почве с максимально высоким уровнем ТМ: комбинации железа, никеля и меди. По сравнению с результатами предыдущего анализа через 90 сут эксперимента обнаружено заметное увеличение численности железоокисляющих микроорганизмов, которая была сравнима с данным показателем в контрольной чистой почве или выше (в среднем в 2,5 раза). Исключением явились варианты почвы, загрязненной 10 и 50ПДК Cu(II), в которых содержание железоокисляющих микроорганизмов уменьшилось по сравнению с предыдущим анализом. Максимальная стимуляция роста железоокисляющих микроорганизмов через 90 сут эксперимента (в 16,2 раза) обнаружена в почве с самым высоким уровнем ТМ в полной комбинации. Было установлено, что с увеличением времени нахождения ТМ в почве доля железоокисляющих микроорганизмов в почвенных микробоценозах увеличивается. Обнаруженные тенденции развития почвенных микроорганизмов способствуют лучшему пониманию процессов, происходящих в почвах при антропогенном загрязнении.

МЕХАНОСЕНСОРНЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ БАКТЕРИЙ

Кацы Е.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
ei_katsy@mail.ru

Механические силы влияют на всё живое [1, 2]. Например, в ответ на физические контакты с биотическими и абиотическими поверхностями может меняться морфология и вирулентность бактерий, осуществляться их переход от свободного плавания к роению или к адгезии на субстрате и строительству биопленок. Эти и многие другие аспекты механобиологии бактерий важны и для других организмов, включая человека. Поэтому необходимо получение наиболее полных сведений о структурах и молекулярных событиях, обеспечивающих механоответы бактерий. Активность мембранных механочувствительных каналов бактерий, открывающихся при деформации липидного бислоя клеточной мембраны, очевидно, способствует осморегуляции [3]. Выявленные у некоторых бактерий чувствительные к деформации клеточной стенки мембранные белки входят в состав сенсорно-регуляторных систем, передающих механосигналы к генетическому аппарату клетки [4]. Механосенсорные функции, по-видимому, могут выполнять и экстраклеточные органеллы – пили 1 и 4а типов и жгутики, первыми вступающие в контакт с микроокружением бактерий.

Гетерополимерные пили 1 типа опосредуют маннозочувствительную агглютинацию эритроцитов и адгезию бактерий на субстратах [5]. Пили 4а типа – длинные тонкие органеллы, попеременно вытягивающиеся и сжимающиеся за счет попеременной полимеризации и деполимеризации субъединиц белка-пилина (осуществляемой с помощью двух АТФ-зависимых моторных белков), определяют тянущую подвижность бактерий и формирование их микроколоний на поверхностях [6]. Жгутики – более крупные, чем пили, двигательные органеллы бактерий, состоящие из базального тела, крюка и филамента. Базальное тело, выполняющее функции якоря жгутика в оболочке клетки, мотора и экспортной машины, включает несколько кольцевых белковых комплексов, стержень и систему секреции III типа. Эта система секреции экспортирует нужные белки через центральный канал жгутика в процессе его сборки. Вращение бактериальных жгутиков обеспечивается работой мотора, состоящего из ротора и статора. Мотор приводится в движение, в зависимости от организма и типа жгутика, потоком ионов водорода или ионов натрия через плазматическую мембрану; гидролиз АТФ для вращения жгутиков бактерий не требуется. Вращающаяся часть мотора состоит из набора колец, пронизывающих оболочку клетки и включающих несколько сотен молекул более 10 разных белков. Мотор может вращаться в разном направлении, обеспечивая или поступательное движение клетки или ее кувырок и переориентацию в пространстве [7].

В обзорном докладе будут рассмотрены ключевые работы, позволившие сформулировать (нередко гипотетические) выводы об участии пилей 1 и 4а типов и компонентов жгутиков в процессах восприятия бактериями механических воздействий и выработки ответа на них.

1. Ohashi *et al.* (2017) *J. Biochem.* 161: 245–254.
2. Trubelja *et al.* (2018) *Extreme Mech. Lett.* 20: 91–98.
3. Sukharev *et al.* (1999) *J. Gen. Physiol.* 113: 525–540.
4. Otto *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2287–2292.
5. Busch *et al.* (2012) *Phil. Trans. R. Soc. B.* 367: 1112–1122.
6. McCallum *et al.* (2017) *Nat. Commun.* 8: 15091.
7. Minamino. (2014) *Biochim. Biophys. Acta.* 1843: 1642–1648.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ И ГОРОХА В ФИТОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

Кенджиева А.А., Рафикова Г.Ф., Кузина Е.В., Бакаева М.Д.
Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН, Россия, Уфа
biolab316@yandex.ru

Фиторемедиация приобрела большую популярность, что обусловлено её низкой стоимостью и простотой технологической реализации [1]. С помощью растений можно избавиться от многих загрязнителей, включая металлы, пестициды, компоненты взрывчатых веществ, нефтяные пятна и др. При этом разложение поллютантов производится как самими растениями, так и микроорганизмами, обитающими в их ризосфере [2]. Цель данной работы состояла в сравнении эффективности применения растений, относящихся к различным семействам (злаки и бобовые), для фиторемедиации нефтезагрязненных почв.

Объектами исследования служили: ячмень *Hordeum vulgare* L. сорта Челябинский 99 и горох посевной *Pisum sativum* L. сорта Чишминский 229. Растения выращивали в условиях искусственного освещения с 14-часовым фотопериодом при температуре 22–26°C. Двухсуточные проростки высаживали в сосуды с почвой, предварительно смешанной с 10% песка и загрязненной нефтью в концентрации 5%, 8%, 12% от массы почвы. Влажность поддерживали на уровне 60–80% от полной влагоемкости. В контрольных вариантах растения выращивали в отсутствие нефтяного загрязнения. В конце эксперимента измеряли массу побегов и корней растений, оценивали содержание остаточных углеводов, а также численность углеводородокисляющих микроорганизмов в ризосфере растений. Продолжительность эксперимента в случае ячменя составила 11 дней, поскольку к концу этого срока на листьях данной культуры появились некротические пятна, растения гороха выращивали 17 суток. Установлено, что минимальная концентрация нефти (4%) не влияла на выживаемость посаженных проростков растений, максимальная концентрация (12%) почти полностью подавляла прорастание семян. Накопление массы побега и удлинение листьев замедлялось под влиянием загрязнения. Так, уже на фоне минимальной концентрации загрязнителя у ячменя масса побега составляла 48% по сравнению с контролем, длина и масса стебля у гороха составили от 80 до 70% от контроля. При этом на фоне минимальной и промежуточной концентраций нефти (4 и 8%) масса корней растений не снижалась.

Известно, что в начальный период своего развития растение наиболее интенсивно выделяет в почву органические вещества, что объясняет значительный скачок численности микроорганизмов в ризосфере растения-хозяина в течение первых двух недель роста. Число углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в ризосфере исследуемых растений к концу опыта возросло на 2-3 порядка по сравнению с численностью УОМ в исходной почве. В ризосфере гороха микробиота была более многочисленна, чем у ячменя. Это, по-видимому, связано с разным составом корневых выделений растений. Известно, что корневые экссудаты бобовых богаче, чем у злаков, содержат много азотистых и углеродистых веществ. В вариантах без внесения нефти численность УОМ была на порядок ниже, чем в присутствии загрязнителя.

В целом установлено, что за время эксперимента содержание нефти в почве снизилось на 35-44% в зависимости от первоначального загрязнения. Максимальная эффективность фиторемедиации отмечена в варианте с использованием гороха при минимальном исходном уровне загрязнения (4%).

1. Adipah *et al.* (2018) *J. Environ Sci Public Health*. 2: 168–178.
2. Kamath *et al.* (2004) *Stud. Surf. Sci. Catal.* 151: 447–478.

Работа выполнена по гранту РФФИ №18-29-05025

МОНИТОРИНГ СИНТЕЗА ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА БАКТЕРИЕЙ *Azospirillum brasilense* Sp7 В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОГО СТРЕССА

Кенжегулов О.А., Дятлова Ю.А., Тугарова А.В., Камнев А.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
odyssey94.sid@mail.ru

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой сложные полиэфиры, синтезируемые многими микроорганизмами в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды. Среди последних наиболее распространенными факторами, индуцирующими биосинтез и накопление ПГА, являются условия несбалансированного по питательным веществам роста (в частности, дефицит связанного азота при наличии достаточного количества органического углерода, усваиваемого клетками). Большое внимание исследователей сосредоточено на анализе биосинтеза и свойств поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) – одного из наиболее простых полиэфиров класса ПГА микробного происхождения. Так, вид *Azospirillum brasilense*, относящийся к стимулирующим рост и развитие растений бактериям, синтезирует гомополимер – ПГБ – в ответ на воздействие различных стрессовых факторов [1]. Изучение различных аспектов синтеза ПГБ является необходимым условием как для понимания существования бактерий рода *Azospirillum* в естественных условиях обитания, так и для создания и совершенствования биоудобрений на их основе для более широкого применения в сельскохозяйственной биотехнологии.

Целью данной работы был мониторинг синтеза ПГБ при культивировании бактерии *A. brasilense* в присутствии тяжелых металлов и в условиях дефицита азота в среде. В качестве объекта исследования был использован штамм *A. brasilense* Sp7. Для мониторинга синтеза ПГБ исследуемый штамм выращивали на синтетической малатной среде с содержанием различных концентраций NH_4Cl (0,5 и 0,1 г/л) и соли одного из металлов (0,1 мМ Cu или Co). Культуры выращивали в аэробных условиях (качалка, 120 об./мин) при температуре 31°C. В стерильных условиях отбирали по 10 мл культуры через 18 и 48 ч. Мониторинг синтеза ПГБ клетками осуществляли методом ИК-фурье-спектроскопии (ИКФС) *in situ* (без выделения ПГБ из биомассы). Метод ИКФС позволяет проводить мониторинг относительного содержания ПГА в таких многокомпонентных системах, как бактериальные клетки, по интенсивности характеристических полос поглощения ПГБ. При накоплении ПГБ на ИК-спектрах усиливается поглощение в ряде областей, в том числе при 1720–1750 см^{-1} , что соответствует валентным колебаниям карбонильной группы сложноэфирного фрагмента ПГБ. Данная полоса используется как маркер ПГБ при анализе ИК-спектров. Относительное содержание ПГБ в биомассе определяли как соотношение площади данного маркера к площади полосы амид-II около 1540 см^{-1} (одна из характеристических полос клеточных белков) [1]. Было показано, что накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 происходило более интенсивно на фоне трофического стресса – в среде с низким содержанием NH_4Cl (0,1 г/л) – и возрастало с увеличением времени выращивания с 18 ч до 2 сут. При внесении в среду с 0,1 г/л NH_4Cl солей тяжелых металлов наблюдалось увеличение относительного содержания ПГБ по сравнению с контролем (без металлов): в случае Co – уже после 18 ч, сохраняясь после 2 сут; в случае Cu увеличение было заметно после 2 сут. Содержание ПГБ в образцах биомассы, выращенной при содержании 0,5 г/л NH_4Cl в среде, было минимальным, что проявлялось в появлении очень слабых полос карбонильной группы сложноэфирного фрагмента ПГБ на ИК-спектрах после 18 ч роста и в наличии слабого плеча – после 2 сут. Таким образом, в данной работе отмечено совместное влияние недостатка связанного азота и присутствия тяжелых металлов на синтез и накопление ПГБ штаммом *A. brasilense* Sp7 при выращивании культуры в течение 18 ч и 2 сут.

1. Kamnev *et al.* (2012) *Appl. Soil Ecol.* 61: 213–216.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 17-08-01696-а

КОНВЕРСИЯ РУТИНА И КВЕРЦЕТИНА В ДИНАМИКЕ РОСТА *Azospirillum brasilense*

Кошелева И.С.¹, Каневский М.В.^{1,2}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
Russia, Saratov,
irishka-kosheleva@mail.ru

Флавоноиды выступают в роли сигнальных молекул при формировании растительно-бактериальных взаимодействий. По результатам исследований была установлена способность некоторых представителей почвенных бактерий модифицировать флавоноиды, влияя на их растворимость и, как следствие, подвижность в почве. Однако в современной литературе практически отсутствует информация о роли бактерий рода *Azospirillum* в миграции флавоноидов в почве.

Целью данного исследования стало выявление способности *A. brasilense* Sp7 и Sp245 к модификации рутина и кверцетина.

Культивирование азоспирилл проводили на богатой среде LB/2 и различных вариациях синтетической малатно-солевой среды (МС-1, лишенной витаминов и солей железа, МС-2, лишенной витаминов, солей железа и малата натрия) в течение 7 суток. Рутин вносили в среду для достижения конечной концентрации 75 мкг/мл, кверцетин – для достижения конечной концентрации 37,5 мкг/мл [1].

Оценку интенсивности роста культуры осуществляли по изменению оптической плотности клеточной суспензии.

Исследование культуральной жидкости на наличие флавоноидов и продуктов их модификации проводилось с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в градиенте вода-ацетонитрил. В качестве стандартов использовали растворы кверцетина и рутина в ДМСО.

Влияние флавоноидов на интенсивность роста культуры было различно по отношению к исследуемым штаммам. При внесении рутина в состав питательной среды выявлена интенсификация роста культуры для штамма *A. brasilense* Sp7 (при культивировании на среде LB/2) и *A. brasilense* Sp245 (при культивировании на среде МС-1). Культивирование обоих штаммов в присутствии кверцетина привело к увеличению интенсивности роста на богатой среде LB/2 и синтетической среде МС-1. В остальных случаях исследуемые культуры уступают по данному показателю контрольным образцам. Полученные данные свидетельствуют о том, что *A. brasilense* Sp7 и Sp245 не используют рутин и кверцетин в качестве источника углерода.

Методом ВЭЖХ было установлено, что *A. brasilense* Sp7 и Sp245 способны модифицировать рутин при культивировании на среде LB/2 и кверцетин при культивировании на богатой и синтетических питательных средах. Выявлены отличия профилей фенольных соединений в образцах КЖ Sp245 и Sp7, что может свидетельствовать о штаммовых различиях по способности к конверсии кверцетина.

1. Петрунина и др. (2014) *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер.* 14: 83–88.

БИОДЕСТРУКЦИЯ ТОКСИЧНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ-ПОЛЛЮТАНТОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *Azospirillum*

Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
kupryashina_m@mail.ru

В последние годы в связи с быстрым ростом индустриализации и катастрофическими масштабами загрязнения окружающей среды особое внимание уделяется биоредукции красителей-поллютантов. Однако, остается много нерешенных вопросов в данной области, касающихся выбора биообъекта, подбора условий деградации, сокращения времени и ресурсов, затраченных на данный процесс, а самое главное минимизации рисков вторичного загрязнения, и образования токсичных отходов. В качестве главных деструкторов органо-поллютантов в основном рассматриваются грибные культуры, тогда как работы по исследованию способности бактерий к детоксикации и утилизации синтетических красителей крайне малочисленны. По современным представлениям биоредукция красителей осуществляется либо путем адсорбции на микробной биомассе, либо за счет ферментативных реакций. Существуют факты и доказательства участия ферментов фенолоксидазного комплекса в деструкции синтетических красителей, в связи с этим особое внимание уделяется изучению процессов биодеколоризации продуцентами лакказ, Мп- и лигнин-пероксидаз.

Новым вектором биоремедиации является использование объектов с полифункциональными свойствами, которые способны не только деградировать опасные поллютанты, но и оказывать другие положительные эффекты. Бактерии рода *Azospirillum* являются ключевым звеном в трансформации биогенных и абиогенных элементов в почве и образуют с растениями симбиозы, играющие важную роль в минеральном питании, продуктивности и адаптации растений к среде обитания. В тоже время азоспириллы обладают способностью к продукции пула фенолоксилирующих ферментов.

Проведенный в ходе нашего исследования скрининг выявил штамм *A. brasilense* SR80 с высокой эффективностью деколоризации токсичных красителей – малахитового зеленого и ремазола ярко-голубого, максимальный процент обесцвечивания ремазола ярко-голубого составил около 50%, малахитового зеленого более 90%. Выявлено, что применение бесклеточных экстрактов азоспирилл, позволяет сократить срок 100% деструкции малахитового зеленого до 5 часов. С помощью методов УФ-видимой спектроскопии, ТСХ ВЭЖХ и ИК-спектроскопии подтверждена деградация молекулы малахитового зеленого. Получены приоритетные данные о снижении токсичности синтетических красителей после биоредукции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-316-00008 мол_а

ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ФЕНОЛОКСИДАЗНОГО КОМПЛЕКСА БАКТЕРИЙ РОДА *Azospirillum*

Каранетян Л.А.¹, Купряшина М.А.², Пономарева Е.Г.², Никитина В.Е.²

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
derpmeifter132@gmail.com

В последние годы не ослабевает интерес к исследованию ферментов, входящих в фенолоксидазные и лигнинолитические комплексы грибов и бактерий, в связи с их каталитическими особенностями и возможностью широкого прикладного использования. Актуальным остается исследование физиологии их продукции. Основной пласт работ в этой области сосредоточен на грибных системах, при этом крайне мало данных о влиянии различных факторов, ингибиторов и индукторов на продукцию аналогичных ферментов бактериями, а о воздействии на функционирование всей фенолоксидазной системы бактерий в целом данные вообще отсутствуют. Исследования, проведенные на сегодняшний день, демонстрируют как сходства, так и различия каталитических свойств данной группы ферментов, продуцируемых различными организмами. Сообщается, что в роли индукторов и ингибиторов лигнинолитических ферментов могут выступать ионы металлов.

В ходе данной работы было исследовано влияние ионов металлов на активность основных ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл, а именно лакказы, лигнин- и Мп-пероксидазы. В качестве объектов были выбраны штаммы *A. brasilense* Sp245 и SR 80, из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. В условиях эксперимента при пассаже бактерий в среду выращивания вносили MnSO_4 , CaCl_2 , ZnSO_4 , MgSO_4 , CuSO_4 , NaCl в концентрации 1, 5 и 10 мМ.

Установлено, что присутствие ионов Zn^{2+} в среде культивирования приводит к снижению удельной активности лакказы и Мп-пероксидазы на 55-90% в зависимости от концентрации, однако не оказывает существенного влияния на активность лигнин-пероксидазы. Ионы Mn^{2+} стимулируют активность ферментов фенолоксидазного комплекса, однако внесение высоких концентраций марганца снижает продукцию всех исследуемых ферментов. Установлены общие закономерности индукции фенолоксидазной системы азоспирилл ионами меди, и ингибирования энзиматического статуса бактерий при внесении хлорид-ионов.

Роль ионов металлов в механизме каталитического действия ферментов многообразна и не всегда поддается однозначной интерпретации. Ионы металлов участвуют в ферментативном катализе, играя важную роль во взаимодействии белка с лигандом. В результате такого взаимодействия изменяются свойства каталитического центра фермента или центра связывания лиганда. Каталитическая активность ферментов, являющаяся их важнейшей характеристикой, может существенно различаться в зависимости от типа взаимодействия ионов металлов с ферментами. Поэтому изучение влияния ионов металлов на активность ферментов имеет не только большое практическое значение, но и теоретическое. Наибольшее значение в регуляции активности ферментов, по-видимому, имеют те ионы, которые способны включаться в этапы биосинтеза и биоразрушения, усиливающие или угнетающие активность ферментов (выполняя роль активаторов или ингибиторов) и не являющиеся их обязательной составной частью.

В ходе проведенной экспериментальной работы выявлено влияние ионов металлов на активность ферментов фенолоксидазного комплекса азоспирилл. При сравнении полученных сведений с данными литературы, обнаружены ингибиторы и индукторы ферментативной активности, аутентичные как лакказам, лигнин- и Мп-пероксидазам грибного, так и бактериального происхождения.

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЗАЩИТНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ПОЧВЕННЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ

Маслова М.В.¹, Грошева Е.В.¹, Будаговский А.В.^{1,2}, Будаговская О.Н.^{1,2}

¹ Мичуринский государственный аграрный университет, Россия, Мичуринск

² Федеральный научный центр им И.В. Мичурина, Россия, Мичуринск
marinamaslova2009@mail.ru

Основой для разработок экологически безопасных программ по борьбе с болезнями растений является использование биологических средств защиты [1]. Актуальным направлением исследований, способствующим их более широкому внедрению в практику сельского хозяйства, до сих пор остается повышение функциональной активности микроорганизмов-антагонистов патогенов. Одним из способов решения данной проблемы является применение лазерного излучения. При его воздействии у микробных клеток отмечается стимуляция физиологических процессов, что обеспечивает выраженный фунгицидный эффект [2]. Поэтому целесообразно применять рабочие растворы биологических препаратов со сниженной концентрацией после обработки когерентным светом.

Оценка эффективности биопрепаратов Алирин - Б и Ризоплан с концентрацией 0,25 г/л и 0,25% соответственно, проводилась в условиях пленочной теплицы на горшечных растениях томата и перца, выращиваемых с использованием торфяной смеси в качестве субстрата. Рабочие растворы исследуемых средств защиты предварительно подвергали обработке лазерным излучением (длительность экспозиции 60 с, 120 с, 240 с, 480 с; длина волны 660 нм; плотность мощности 2,5 Вт/м²). Контролем служили образцы без применения облучения. Через 2-е суток после обработки брали пробы субстрата, суспензировали в стерильной воде и высевали на картофельно-глюкозный агар. Учёт и идентификацию колоний микроорганизмов осуществляли с последующим пересчётом на 1 мл грунта.

При внесении в грунт облученного препарата Алирин-Б со сниженной концентрацией в ризосфере исследуемых растений число бактерий на 1 мл грунта прикорневой зоны растений в среднем увеличилось на 47,5%. Это способствовало снижению числа клеток грибов родов *Penicillium* и *Alternaria* в грунте на 44,0% и 56,3% соответственно.

Применение облученного препарата Ризоплан позволило повысить содержание в грунте биоагентов фунгицидного действия на 51,5% по сравнению с вариантами, где облучение не применяли.

Активное развитие бактериальной микробиоты в грунте привело к снижению уровня накопления грибной инфекции. Количество КОЕ грибов *Penicillium*, *Alternaria* и *Fusarium* в субстрате после проведения обработки рабочим раствором Ризоплана без облучения составило 160, 60 и 90 соответственно. Применение облученного препарата снизило число клеток гриба *Penicillium* в образцах грунта до 45 (на 72%). *Alternaria* в вариантах с облученным рабочим раствором Ризоплана только в эксперименте с лазерной обработкой 480 с наблюдался ослабленный рост патогена. Развитие представителей рода *Fusarium* было полностью подавлено во всех образцах грунта, где применяли облученный биопрепарат.

Проведенные эксперименты показали, что кратковременная лазерная обработка способна повысить активность бактерий из биопрепаратов. Технологии, основанные на установленном явлении, могут быть востребованы в органическом земледелии для повышения эффективности биологических средств защиты растений от болезней.

1. Петровский и др. (2017) *Защита и карантин растений*. 2: 14–18.
2. Budagovsky et al. (2017) *Quantum Electronics*. 47: 158–162.

УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРОБИОТЫ К БЕЛОМУ ФОСФОРУ

Миндубаев А.З.¹, Волошина А.Д.¹, Бабынин Э.В.², Бадеева Е.К.¹

¹ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

Белый фосфор Р₄ является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Но продукт его окисления фосфат необходим всем живым организмам. Целью является переработка белого фосфора при помощи микроорганизмов [1]. Данная работа является продолжением цикла наших исследований.

Посев аспергилла в среду, содержащую сразу два источника фосфора – классическая смесь гидрофосфата и дигидрофосфата, и белый фосфор, вызывает большой интерес. Культура *Aspergillus niger* AM1 выращивалась в чашках Петри на агаризованной среде. При этом посев производился не в трех, а в четырех вариантах: модифицированная среда Придхем-Готлиба без источников фосфора, с фосфатом, с 0,2% белого фосфора и, четвертый вариант – с 0,2% Р₄ и с фосфатом (в той же концентрации, что во втором варианте). Все четыре варианта посева произведены в трех повторах. На 12 сутки после посева *A. niger* AM1 в четыре варианта среды, наблюдалась следующая картина. В средах без источников фосфора рост практически не наблюдается. В средах с фосфатом аспергилл хорошо растет и спороносит, однако культура не чистая, помимо аспергилла присутствуют колонии других микроорганизмов. В средах с 0,2% белого фосфора колонии аспергилла имеют пониженную фертильность. Очень интересный результат показал четвертый вариант посева – с белым фосфором и фосфатом. Колонии растут очень хорошо, даже более развитые, чем в среде с фосфатом, причем в двух случаях из трех выросла чистая культура (в одном появилась кремовая колония неизвестного вида). То есть медленный рост аспергилла в среде с белым фосфором объясняется не токсичностью последнего для данного штамма, а исключительно его труднодоступностью как источника фосфора! Р₄, судя по всему, нетоксичен для данного гриба, по крайней мере, в исследованных нами концентрациях.

Поскольку белый фосфор при комнатной температуре активно реагирует с ионами двухвалентной меди, до последнего времени не был подтвержден факт его биodeградации: превращения можно было объяснить химической реакцией. Мы впервые провели дальнейшую модификацию среды Придхем-Готлиба, исключив из ее состава не только источник фосфора фосфат, но и сульфат меди. В культуральной среде, не содержащей сульфат меди, рост грибов не отличается от роста в контроле с медью. Следует отметить, что при внесении эмульсии белого фосфора в среду, не содержащую медь, не наблюдалось выпадение черного осадка, отмеченное нами в более ранних работах. Значит, Р₄ не вступает в химическую реакцию и сохраняется в среде более длительное время. Этот факт является дополнительным аргументом в пользу того, что имеет место биodeградация белого фосфора, а не химическая нейтрализация ионами меди.

Очень большой интерес представляет исследование генотоксичности – возможного источника мутаций. Белый фосфор в концентрации 62,5 мкг/мл является слабым мутагеном. Р₄ в концентрации 1000 мкг/мл убивает культуру за 9 часов эксперимента. Т.е., общая токсичность белого фосфора намного превосходит его генотоксичность [2].

1. Миндубаев и др. Сборник тезисов «Стратегия взаимодействия ...». Саратов, 2016, С. 66.
2. Миндубаев и др. (2019) *Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 9(1): 81–94.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТНОГО И УГЛЕРОДНОГО ПИТАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ИНГИБИТОРОВ А – АМИЛАЗЫ В ЭНДОФИТНЫХ ГРИБАХ

Мухаммедов И.И., Шухратова М.Л., Расулова Г.А., Каримова Ф.А.

Институт Микробиологии АН РУз, Узбекистан, Ташкент

imb-anruz@mail.ru

Среди эндокринных заболеваний сахарный диабет отнесён к числу актуальных и социально значимых проблем современного общества. В арсенал применяемых в терапии антигипергликемических пероральных препаратов входят ингибиторы α -глюкозидазы и α -амилазы [1].

В результате проведенных исследований по изучению эндофитной микробиоты лекарственных растений Узбекистана установлено, что самый высокий уровень подавления α -амилазы в пределах 60–80%, сравнимый с действием коммерческого ингибитора гликозидаз - Акарбозы, наблюдается в эндофитных грибах *Penicillium sp.* CC200 и *Aspergillus egypticus* HT166S, выделенных из растений *Celosia cristata* и *Helianthus tuberosus* [2].

В этой связи, с целью увеличения уровня продукции вторичных метаболитов с ингибиторной активностью, нами проведен скрининг питательных сред и их оптимизация по источникам углеродного питания (лактоза, глюкоза, сахароза) и по органическим и неорганическим источникам азотного питания – (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гидролизат казеина, пептон, дрожжевой экстракт).

В результате скрининга сред в качестве базовой отобрана среда Чапека-Докса, обеспечивающая наиболее высокий выход вторичных метаболитов с гипогликемической активностью – 88,7% на 7 сутки глубинного культивирования при использовании сахарозы в концентрации 60 г/л среды.

Установлено, что органические источники азота – казеин и пептон способствуют увеличению продуцирования вторичных метаболитов с ингибиторной активностью в штамме *P. brevicale alba Thom* CC 200 до 92,3% и 82,6%, и в штамме *Aspergillus egypticus* HT166S – 83% и 85,1%, соответственно. При добавлении в среду с казеином дрожжевого экстракта, как дополнительного источника азота, происходит существенное увеличение уровня активности вторичных метаболитов – ингибиторов α -амилазы у штамма *P. brevicale alba Thom* CC 200 до 96,8%, а у штамма *Aspergillus egypticus* HT166S до 86,9%.

В результате исследований нами разработан состав модифицированной питательной среды, способствующей увеличению выхода вторичных метаболитов с высокой гипогликемической активностью для разработки технологии производства новых гипогликемических препаратов.

1. Камынина и др. (2012) Автореферат диссертации. Москва, 2012. 135 с.
2. Ruzieva et al. (2017) *Int. J. of Cur.Microbiol. and Appl. Sci.* 6: 2744–2752.

ВЛИЯНИЕ СЕЛЕНА НА МИКРОМИЦЕТЫ И ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ ИХ ОТВЕТА

Миенская Н.С., Стручкова И.В., Апрятина К.В.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени
Н.И. Лобачевского, Россия, Нижний Новгород
tasya.mshanka@yandex.ru

Нижегородская область, как и некоторые другие территории Российской Федерации, относятся к регионам с низким содержанием селена в почвах и водах, а, следовательно, и в овощной и зерновой продукции. Поскольку селен необходим в организме человека, но прямое потребление его неорганических соединений достаточно опасно, одним из подходов в решении проблемы селенодефицита является внесение селена под сельскохозяйственные культуры, в виде селенита натрия как наиболее дешевого соединения или, значительно реже – в виде нуль-валентного селена, стабилизированного на различных органических полимерах.

Нами изучалось влияние селена в форме неорганической соли Na_2SeO_3 , а также в форме Se^0 , стабилизированного хитозаном (x-Se^0), на рост пяти широко распространенных в почвах видов микромицетов – *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma virens*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*.

При культивировании микромицетов на питательных средах с концентрацией Se 100 мкМ оценивали морфологию и скорость роста колоний, сухую массу 12-дневного мицелия, а также определяли содержание накопленного селена в 12-дневном мицелии путем мокрого сжигания и флюориметрии по МУК 4.1.033-95.

Установлено ингибирующее воздействие обеих форм селена на рост микромицетов: развивались колонии меньшего диаметра. Однако степень воздействия зависела от вида организма. По сравнению с контролем (без Se) сухая масса мицелия 12-суточных культур под действием селенита натрия снижалась у *A. terreus* (на 84%), но возрастала у *A. niger* (на 55%). Под действием x-Se^0 биомасса снижалась по сравнению с контролем и вариантом внесения хитозана (являющегося стабилизатором в препарате x-Se^0), но без Se, у *A. alternata* (на 71% и 24% соответственно), у *A. terreus* (на 62% и 28% соответственно).

При наличии Se 100мкМ в среде роста у всех видов, за исключением *A. alternata*, отмечено окрашивание (покраснение) субстратного мицелия, свидетельствующее об отложении в нем частиц Se^0 .

При росте как на селените натрия, так и на препарате Se^0 максимальной способностью накапливать селен обладает *A. niger* – 4-7 мг/г сухой массы мицелия. Накопление селена другими видами было вдвое меньше.

Таким образом, селен в концентрации 100 мкМ ингибирует рост грибов, причем разные виды микромицетов в разной степени подвержены токсическому воздействию селена, как в форме селенита натрия, так и в форме хитозансодержащего препарата Se^0 . Это следует принимать во внимание при использовании селеновых препаратов для обработки полей, чтобы избежать негативных изменений микоценозов почв.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФУНГАЛЬНОЙ, РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕЙ И
ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ
Bacillus И *Pseudomonas* – АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ В
РИЗОСФЕРЕ И ФИЛЛОСФЕРЕ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР**

Павлова М.Д., Асатурова А.М.

Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений,
Россия, Краснодар
fridaamely@yandex.ru

В лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов ВНИИБЗР собрана обширная коллекция штаммов бактерий, обладающих антагонистическими свойствами в отношении фитопатогенных грибов. Среди наиболее перспективных – штаммы *Bacillus subtilis* BZR 336g, *Bacillus subtilis* BZR 517, *Pseudomonas chlororaphis* 245-F и *Pseudomonas fulva* 523-2, обладающие хорошим потенциалом для применения в биологической защите растений и создания биопрепаратов на их основе. Представлены исследования антифунгальных и ростстимулирующих свойств данных штаммов *Bacillus* и *Pseudomonas* в сравнительном аспекте, в том числе с целью изучения природы взаимодействий в системе «растение–патоген–антагонист». В качестве патогенных тест-объектов были выбраны *Fusarium graminearum* Schwabe и *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechsler- микромицеты с различной биологией, заселяющие различные экологические ниши растения: ризосферу и филлосферу.

Микроскопические наблюдения совместно культивируемых штаммов-антагонистов и патогенов показали следующие негативные изменения строения мицелия обоих видов грибов: укорочение, утолщение, искривление сегментов мицелия, разрушение клеточной стенки и выход клеточного содержимого, а также хемотаксис бактериальных клеток по направлению к гифам, лизис гиф и использование их содержимого в качестве источника питания. При этом мицелий *P. tritici-repentis* оказался наиболее уязвимым к действию биоконтрольных штаммов – степень ингибирования его роста составляла 78,5 – 93,9%, тогда как *F. graminearum* 20,7 – 49,2%.

Все исследованные штаммы оказывали ростстимулирующее действие на растения пшеницы: зафиксировано увеличение массы корней двухнедельных проростков на 15,6-18%, длины корня – на 19,5-20,1%, длины побега – на 14,3%. Фосфатмобилизирующую активность штаммов определяли на питательной среде NBRIP [1], содержащей нерастворимый $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора. На седьмые сутки культивирования вокруг лунок с жидкой культурой *Bacillus* не наблюдалось зон просветления, тогда как вокруг лунки *P. chlororaphis* 245-F она составляла 3-4 мм, а *P. fulva* 523-2 – 5-6 мм.

Количественная оценка фосфатмобилизирующей активности штаммов в 3х-суточных культурах показала снижение концентрации растворимых фосфатов с 20 мг/л до 0,1 мг/л в культуральной жидкости *P. chlororaphis* 245-F и *P. fulva* 523-2 и до 5-7 мг/л у *B. subtilis* BZR 336g, *B. subtilis* BZR 517. Таким образом, у штаммов *Pseudomonas* определена выраженная способность растворять неорганический фосфат кальция, однако, по-видимому, высвобожденный фосфат используется ими по большей части для собственного роста. Является ли обнаруженная фосфатмобилизирующая активность перспективной для минерального питания растений – предмет дальнейших исследований.

1. Nautiyal. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265–270.

РОЛЬ ВЫСШИХ ГРИБОВ В САМООЧИЩЕНИИ ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ОТ ПОЛЛЮТАНТОВ

Позднякова Н.Н., Турковская О.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
pozdneyakova_n@ibppm.ru

В связи с масштабным загрязнением окружающей среды исследование механизмов детоксикации и биodeградации поллютантов приобретает особенно важное значение. Детоксикация и деградация поллютантов, как правило, идет с участием в основном тех же биохимических механизмов, которые имелись у клеток для утилизации природных веществ, что лежит в основе самоочищающего потенциала природных экосистем. Одной из многочисленных групп организмов, вносящих серьезный вклад в процессы самоочищения природы, являются грибы [1]. Как неотъемлемый компонент наземных и водных биоценозов грибы контролируют широкий спектр биосферных функций, среди которых разложение органических веществ является наиболее существенной [2].

Одной из самых больших проблем в настоящее время стало попадание нефти в окружающую среду. Несмотря на то, что деградация нефти и нефтепродуктов грибами описана в литературе [3, 4] чаще всего оценивается снижение общего содержания нефтепродуктов или снижение фитотоксичности грунта после микоремедиации. Вместе с тем, нефть является многокомпонентной смесью веществ, доступность которых для деградации разными организмами может значительно отличаться. Это может приводить к утилизации одних компонентов и накоплению других, таких как ПАУ, представляющих серьезную опасность для окружающей среды.

В представленной работе исследовалось изменение фракционного состава нефти после ее деградации базидио- и аскомицетами. В присутствии косубстрата деревообитающие базидиомицеты (*Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune* и *Trametes versicolor*) деградировали нефть на 62–98%, тогда как почвообитающие (*Stropharia rugosoannulata*, *Agaricus bisporus*) – только на 33–49%. Аскомицеты – представители трех родов (*Lecanicillium aphanocladii*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*) утилизировали нефть более чем на 80%. Обнаружено, что все исследованные грибы могли использовать нефть в качестве единственного источника углерода и энергии. Однако в данном случае наиболее активными оказались базидиомицет *P. ostreatus* Florida и аскомицет *L. aphanocladii*. Изучение изменения фракционного состава нефти после деградации показало, что для грибов были доступны все ее фракции. При этом убыль фракций, включая труднодоступные ПАУ и смолы, достигала 82–97% для *P. ostreatus* Florida, *S. commune* и *T. versicolor* DSM. Аскомицеты *L. aphanocladii* и *F. oxysporum* также утилизировали все фракции нефти, включая труднодоступные.

Таким образом, способность базидио- и аскомицетов утилизировать нефть и ее отдельные фракции не только в присутствии косубстрата, но и в качестве единственного источника углерода и энергии может вносить существенный вклад в процессы самоочищения природных экосистем.

1. Harms et al. (2011) *Nature Reviews. Microbiology*. 9: 177–192.
2. Терехова. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем. М.: Наука, 2007. 215 с.
3. Bhattacharya et al. (2014) *3 Biotech*. 4: 205–211.
4. Garcia-Delgado et al. (2015) *J. Hazard. Material*. 285: 259–266.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта
№ 18-29-05062

ЦИАНОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ И ИХ РОЛЬ В БИОМИНЕРАЛИЗАЦИИ ТРАВЕРТИНОВ

Родина О.А.¹, Верещагин О.С.¹, Власов Д.Ю.¹, Никитин М.Ю.²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный университет телекоммуникаций им. проф. М.А. Бонч-Бруевича, Россия, Санкт-Петербург
oxanarod@yandex.ru

Литобионтные биопленки представляют собой совокупность микроорганизмов, объединенных за счёт внеклеточных полимеров. Деятельность микроорганизмов является ключевым фактором процессов трансформации поверхностного слоя горных пород и первичного почвообразования [1]. Цианобактерии считаются пионерами колонизации минеральных субстратов [2]. Они являются не только агентами биоразрушения каменистых субстратов, но и предположительно участвуют в формировании пресноводных карбонатных отложений [3]. Взаимодействие цианобактерий с карбонатным субстратом, а также генетические связи цианобактерии-карбонаты кальция все еще находится в центре внимания научного сообщества.

Целью данной работы являлось изучение минерального состава карбонатных отложений и видового состава цианобактерий современных рек юга Ленинградской области. Также был проведен эксперимент по выращиванию сообщества с доминированием цианобактерий в накопительной культуре для выявления пространственногенетических связей цианобактерии-карбонаты кальция.

Минеральный состав карбонатных пород представлен двумя полиморфными модификациями карбоната кальция ($\text{Ca}(\text{CO}_3)$) – кальцитом и арагонитом. Арагонит установлен только в пробах в ассоциации с обогащенным магнием кальцитом ($\text{MgO} > 1 \text{ мас.}\%$). Цианобактерии были обнаружены только в образцах, которые содержат арагонит. В ходе исследования идентифицировано 29 таксонов цианобактерий. Наиболее распространены виды из рода *Phormidium*. В одном из образцов был обнаружен один трихом *Calothrix* sp., который имел слизистую оболочку, полностью покрытую карбонатными частицами. Этот образец был использован для последующего выращивания сообщества в накопительной культуре. Через год *Calothrix* sp. начал доминировать в сообществе, и почти полностью покрылся минеральными частицами. Результат рентгенофазового анализа (РФА) показал, что Mg-кальцит является основной фазой этого покрытия. Однако арагонит не был найден.

Таким образом, факт ассоциации минеральных частиц со слизистыми оболочками *Calothrix* sp. подтверждается с помощью оптической и сканирующей электронной микроскопии, а также с помощью РФА. Природные образцы карбонатных отложений с цианобактериями содержат кальцит и арагонит. Необходимо провести дальнейшие эксперименты для установления генетической связи между цианобактериями и карбонатами, а также выявления причин нахождения арагонита только в природных образцах. Исследования выполнены с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ «Рентгендифракционные методы исследования», «Геомодель», «Микроскопия и микроанализ».

1. Сазанова и др. (2016) *Биосфера*. 8: 291–300.
2. Pentecost. *Travertine*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. 446 p.
3. Hauer. (2007) *Nova Hedwigia*. 85(3–4): 379–392.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 19-17-00141)

БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЙ *Azospirillum lipoferum* Sp59b: ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ МАТРИКСА

Рыбальченко Д.А.¹, Евстигнеева С.С.², Федоненко Ю.П.^{1,2}, Коннова С.А.¹

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
arashis@mail.ru

Получение устойчивых ассоциаций культурных растений с ризобактериями, стимулирующими их рост и развитие (PGPR), относится к перспективным направлениям экологически ориентированного сельского хозяйства. PGPR, в том числе бактерии р. *Azospirillum*, вступают в ассоциативные отношения со многими злаковыми культурами, заселяя их корневую систему с образованием биопленок. Такие бактериальные сообщества способствуют повышению сопротивляемости растений к биотическим и абиотическим стрессам. Однако на данный момент сведения о закономерностях формирования биопленок азоспириллами на различных поверхностях носят фрагментарный характер. Целью работы было исследование особенностей образования биопленок типовым штаммом *A. lipoferum* Sp59b и характеристика основных компонентов матрикса.

Для получения биопленок на границе фаз «жидкость-воздух» бактерии *A. lipoferum* Sp59b культивировали в колбах Эрленмейера без перемешивания в минеральной среде, содержащей малат натрия, либо фруктозу в качестве источника углерода. На пятые сутки роста в среде с малатом натрия бактерии формировали морщинистые бледно-розовые биопленки, имеющие толщину $75,2 \pm 3,4$ мкм. В среде с фруктозой биопленки имели большую толщину, достигающую $90,4 \pm 5,5$ мкм, и более выраженную розово-коричневую пигментацию. Из биопленок мягкой деградацией ультразвуком выделяли внеклеточный полимерный матрикс (ВПМ). Из внешних мембран бактериальных клеток экстрагировали горячим водным раствором фенола липополисахариды (ЛПС-Б). Выходы ВПМ и ЛПС-Б составили 13,3 и 5,2% от массы высушенных клеток для среды с малатом и 15,4 и 5,6% для среды с фруктозой. Выходы углеводных компонентов матрикса, полученных с помощью протеиназной обработки, достигали приблизительно 25% от массы ВПМ. На основании анализа химического состава гликаны ВПМ были обозначены как ЛПС-М.

Анализ моносахаридного состава ЛПС-Б и ЛПС-М биопленок *A. lipoferum* Sp59b методом ГЖХ продемонстрировал преобладание в ЛПС-Б при росте бактерий в среде с малатом натрия L-Rha и D-Gal в соотношении $\sim 1:3$, что отличалось от состава ЛПС клеток планктонных форм, полученных ранее [1]. В ЛПС-Б при использовании среды с фруктозой были обнаружены остатки L-Rha и D-Glc в соотношении $\sim 1:1$. Сходный моносахаридный состав был ранее определен для капсульного полисахарида штамма Sp59b, однако содержание остатков L-Rha в нем было в три раза выше [2]. В ЛПС-М биопленок независимо от состава среды культивирования были выявлены остатки L-Rha, D-Glc и D-Gal с соотношением $\sim 1:1.5:1$. Методом электрофореза в ПААГ в составе ВПМ биопленок *A. lipoferum* Sp59b при выращивании в среде с малатом натрия, либо фруктозой было идентифицировано около 20 полипептидов с молекулярными массами в диапазоне 20–100 кДа.

Очевидно, при формировании биопленок бактериями *A. lipoferum* Sp59b происходит модификация структуры ЛПС, что может свидетельствовать о ключевой функции данных гликополимеров как в процессах адаптации, так и при установлении эффективных ассоциативных взаимоотношений с растениями.

1. Fedonenko et al. (2005) *Carbohydr. Res.* 340: 1259–1263.
2. Смолькина и др. (2010) *Биохимия*. 75 (5): 707–716.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект 18-34-00089)

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТАЦИИ *Avena L.* К ХЛОРИДНОМУ ЗАСОЛЕНИЮ ПРИ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД

Симонова Е.О., Субботин А.М.

Тюменский научный центр СО РАН, Россия, Тюмень
mailsimonova@gmail.com

Известно, что на всем протяжении жизни растения его сопровождают ассоциативные микросимбионты – микроорганизмы, способные оказывать положительные эффекты на рост и развитие макросимбионта. Нами была рассмотрена гипотеза о том, что микроорганизмы, адаптированные к условиям многолетней мерзлоты, обладают высокой биологической активностью. Обладая более высоким биохимическим потенциалом, они могут положительно влиять на морфофизиологические и биохимические параметры растений [1, 2]. Цель исследования: выявить влияние микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические параметры растений в условиях хлоридного засоления. Исследования проводились на базе ТюмНЦ СО РАН. Объектом работы послужили семена *Avena L.* сорта Тюменский голозерный, предоставленные НИИСХ Северного Зауралья (г. Тюмень). Из коллекции почвенных микроорганизмов многолетнемерзлых пород ТюмНЦ СО РАН для проведения исследования были отобраны 12 штаммов: 15/62 ts., 8/75-1 ts., 1/06 ch., 10/50 ts., 3/12 ts., 3/07-1ts., 4/22-2 ts., 2/09 ch., 2/06 ts., 6/29 ts., MG8 mg., 11/70 ts. принадлежащих к видам *Bacillus*, *Citrobacter*, *Achromobacter*, *Kocuria*. Предпосевную обработку семян производили путем их замачивания в бактериальных суспензиях (1×10^7 – 1×10^9 КОЕв 1 миллилитре воды) в течение 1 часа. В контрольной группе семена замачивали в дистиллированной воде. Проращивание семян проводили в растильне, в условиях искусственного освещения, при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$, в течение 21 суток, по истечении которых измеряли морфометрические параметры проростков. Определение концентрации пигментов фотосинтеза и свободного пролина проводили методом абсорбционной спектрофотометрии. Исследование показало, что во всех опытных вариантах морфометрические параметры надземной части были достоверно ($p \leq 0,01$) ниже контроля. В трех вариантах параметр длины корня был выше контрольного, девять из двенадцати штаммов повлияли на увеличение числа корней, в шести из них была увеличена также масса корней. В варианте с использованием штамма 10/50 ts, все три параметра корневой системы были достоверно выше контроля. Анализ содержания пигментов фотосинтеза выявил, что показатель стрессуемости (Chl. a/ Chl. b) самый низкий при использовании штаммов 10/50ts., 15/62ts., 8/75-1ts., 3/12ts. Показатель стрессоустойчивости ((Chl. a + Chl. b)/ Car.) [6] в варианте с использованием штамма 10/50ts. был выше, чем во всех опытных вариантах, включая контрольный. Повышенное значение пролина в зеленой части растения (мкмоль/г) отмечено в вариантах 4/22-2ts., 10/50ts. и 11/70ts. По результатам экспериментов можно заключить что некоторые штаммы положительно влияют на устойчивость проростков к осмотическому стрессу. Так, растения при предпосевной обработке семян штаммом 10/50 ts. отличаются по содержанию свободного пролина, морфометрическим параметрам корневой системы, показателю стрессоустойчивости. Штамм *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 депонирован во ВКМ ФГУП ГосНИИ Генетика №В-12405. На данный штамм получен Патент № 2607028.RU. С1.

1. Петров и др. (2016) *Изв. Самарского научного центра Российской академии наук*. 18: 783–788.
2. Субботин и др. (2016) *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 20: 666–672.

ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ (КЕТОНОВ, СПИРТОВ, ТЕРПЕНОВ) НА БИОПЛЕНКИ *Agrobacterium tumefaciens*

Скрипка М.И.^{1,2}, Липасова В.А.², Сидорова Д.Е.², Плюта В.А.², Хмель И.А.²

¹ Российский химико-технологический университет имени Д.И.Менделеева, Россия, Москва

² Институт молекулярной генетики РАН, Россия, Москва

mariya2010_14@mail.ru

Биопленки – это специфически прикрепленные к субстрату сообщества бактерий, существующие в природных экосистемах. Большинство микроорганизмов в природных условиях формируют такую структурную организацию. Характерной особенностью бактерий, обитающих в составе биопленок, является их повышенная устойчивость к воздействию различных неблагоприятных факторов (антибиотиков, pH среды, осмолярности и др.). Способность патогенных и фитопатогенных бактерий формировать биопленки является важной проблемой в медицине, сельском хозяйстве и различных областях науки. Поэтому изучение действия на биопленки различных соединений с антибактериальной активностью представляет большой интерес.

Бактерии способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), модулирующие рост и развитие различных биологических объектов (бактерий, грибов, растений и др.). Продукция ЛОС является новым, слабо изученным аспектом конкурентных отношений микроорганизмов.

Настоящая работа посвящена изучению биологической активности ЛОС с различными структурами, продуцируемых бактериями, а именно кетонов (2-бутанона, 2-пентанона, 2-октанона, β -ионона), терпена лимонена, спиртов (изоамилового и 2-фенилэтанола) на биопленки фитопатогенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* C58 и Chry-5. Для анализа действия ЛОС на биопленки использовался метод colony-biofilms (биопленки выращивали на мембранных фильтрах, помещенных на поверхность агаризованной питательной среды). Этот метод позволяет легко определять количество живых клеток в составе биопленок.

Было показано, что ЛОС способны подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* и убивать бактерии в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в составе сформировавшихся биопленок, происходила при более высоких количествах ЛОС, чем при их образовании. Наибольшее ингибирующее действие на биопленки агробактерий оказывали 2-октанон (10–30 мкмоль на образование и 100–300 мкмоль на зрелые биопленки), изоамиловый спирт (25–200 мкмоль на образование и 200–400 на зрелые биопленки), 2-фенилэтанол (50–300 мкмоль на образование, 100–400 на зрелые биопленки) и 2-пентанон (200–600 мкмоль, причём влияние на *A. tumefaciens* Chry-5 было в большей степени). Слабее действовали β -ионон (200–800 мкмоль на образование), 2-бутанон (100–800 мкмоль, причём наибольшее ингибирующее действие оказывал на *A. tumefaciens* C58) и практически не действовал лимонен (100–600 мкмоль на образование).

Таким образом, в результате выполнения работы получены новые данные о биологической активности ЛОС, представителей различных классов органических соединений, синтезируемых бактериями.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ № 18-34-00396-мол_a и 18-04-00375-a

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ НА ДЕГРАДАЦИЮ ФЕНАНТРЕНА РИЗОБАКТЕРИЕЙ *Ensifer meliloti* P221

Сунгурцева И.Ю., Любунь Е.В., Муратова А.Ю.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
airinmind@yandex.ru

Интенсивное и повсеместное развитие индустриальной деятельности человека непременно приводит к проблеме очистки окружающей среды от многокомпонентных загрязнений. Особенно остро стоит задача очищения почв от токсичных спутников нефтяных загрязнений – полициклических ароматических углеводородов и тяжелых металлов. Перспективными ремедиантами почв от подобного контаминационного комплекса являются представители рода *Ensifer* sp. [1, 2].

С целью определения токсического влияния тяжелого металла на микробную деградацию полициклических ароматических углеводородов исследовали биотрансформацию фенантрена (0,4 г/л) штаммом *Ensifer meliloti* P221 в присутствии различных концентраций кадмия (0; 0,2; 1; 2 ммоль/л). В ходе работы была показана способность ризобактерии к деградации 80% фенантрена. При внесении 0,2 и 1 ммоль/л кадмия была показана тенденция к незначительному снижению биodeградации на 2 и 6 %, соответственно. В присутствии кадмия в концентрации 2 ммоль/л эффективность деградации фенантрена достоверно снижалась на 13%.

С помощью ТСХ кислых фракций культуральной жидкости были получены данные об интермедиатах процесса деградации фенантрена ризосферной бактерией *E. meliloti* P221. В частности, наличие 1-гидрокси-2-нафтойной не зависело от концентрации кадмия и определялось во всех инокулированных штаммом образцах.

Таким образом, было выяснено, что деградация фенантрена ризобактерией *E. meliloti* P221 осуществлялась через расщепление терминального ароматического кольца с образованием интермедиата 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты как в отсутствие, так и в присутствии кадмия. Снижение эффективности биodeградации фенантрена на 13% было достоверно показано при воздействии 2 ммоль/л кадмия.

1. Rossbach *et al.* (2008) *Applied and Environmental Microbiology*. 74(13): 4218–4221.
2. Muratova *et al.* (2014) *Biodegradation*. 25(6): 787–795.

ДИНАМИКА РЕСПИРАТОРНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРЫ *Escherichia coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОЛИФЕНОЛОВ

Тюленев А.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Россия, Пермь
leksey333@yandex.ru

Полифенолы растительного происхождения, входят в состав продуктов питания, биологически активных добавок, лекарственных и косметических средств, и вследствие этого, являются объектами исследований специалистами разных направлений в течение многих лет. Показано положительное действие полифенолов на здоровье человека и животных. Выявленные эффекты связывают, в основном, с высокой редокс-активностью полифенолов, которая, в зависимости от условий, может проявляться как антиоксидантная или прооксидантная активности. Несмотря на длительную историю изучения к настоящему времени нет полного понимания механизмов действия полифенолов на молекулярном уровне, накопленные данные часто носят противоречивый характер. У млекопитающих и человека в состав нормальной микробиоты кишечника входят энтеробактерии *E. coli*, которые могут подвергаться прямому контакту с полифенолами в процессе пищеварения. Одна из мало изученных проблем, на решение которой направлена настоящая работа, связана с изучением действия полифенолов на дыхание бактерий.

Объект исследования: бактерии *E. coli* BW25113 (*wild type*). Бактерии выращивали в аэробных условиях на среде М9 с глюкозой при 37°C в колбах на орбитальном шейкере (150 об/мин). Исследуемые полифенолы – ресвератрол (100 мкг/мл), кверцетин (40 мкг/мл), катехин (100 мкг/мл) и галловую кислоту (50 мкг/мл) вносили в культуру в середине логарифмической фазы роста ($OP_{600}=0,4$). Один из широко применяемых способов измерения дыхательной активности бактерий связан с изъятием проб из культур бактерий. В нашей работе дыхательную активность определяли по изменению парциального давления кислорода (pO_2) *in situ*, непосредственно в культуре бактерий с помощью электрода Кларка на программно-аппаратном комплексе NBS BioFlo 110 в режиме реального времени. Это позволило выявлять даже небольшие изменения pO_2 при обработке растущих бактерий полифенолами.

В бесклеточной питательной среде *in vitro* добавление исследуемых полифенолов не изменяло базовые показатели pO_2 . Внесение ресвератрола, кверцетина или катехина в указанных концентрациях в аэробно растущую культуру бактерий *E. coli* при $pO_2=50\%$ приводило к снижению удельной скорости роста бактерий, которое сопровождалось частичным ингибированием дыхания, о чем свидетельствовало повышение парциального давления кислорода до 60%. Процесс ингибирования длился в течение 15 мин, после чего наблюдалось возобновление роста и возврат дыхательной активности до уровня, регистрируемого до обработки культуры полифенолами. В отличие от указанных выше полифенолов, галловая кислота не оказывала заметного эффекта на респираторную активность бактерий *E. coli*.

Таким образом, полифенолы ресвератрол, кверцетин и катехин, способны модулировать респираторную активность аэробно растущих бактерий *E. coli*, что может вносить вклад в их биологическую активность.

Исследования поддержаны грантом РФФИ-урал № 19-44-590009 и грантом президента РФ МК-3376.2018.4

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛЕКТИНОВ АЗОСПИРИЛЛ, СВЯЗАННЫЙ С ФУНКЦИОНИРОВАНИЕМ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Федорова А.Г., Аленькина С.А., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
alenkina_s@ibppm.ru

Изучение механизмов толерантности и адаптации высших растений к абиотическим воздействиям имеет большое научное и практическое значение. К настоящему времени выявлена группа неспецифических реакций на воздействие неблагоприятных факторов. При этом показано, что одним из самых ранних эффектов является окислительный стресс, обусловленный накоплением активных форм кислорода (АФК). Эффективность работы ферментов-антиоксидантов не всегда достаточна для детоксикации большого количества АФК при развитии окислительного стресса. Это делает необходимым анализ функционирования низкомолекулярных антиоксидантов при действии стрессоров различной природы [1]. *Azospirillum brasilense* обладающие потенциалом стимулировать рост растений, относятся к группе plant-growth-promoting bacteria (PGPB).

Накопившийся обширный массив экспериментальных данных по лектинам азоспирилл позволяет говорить о полифункциональности лектинов. Лектины способны не только обратимо и специфически связываться с клетками-мишенями, но и быть биологически активными веществами способными вызывать клеточные ответы в низких концентрациях. Этот факт нашел подтверждение в предыдущих исследованиях по изучению влияния лектинов азоспирилл на прорастание семян, на митогенную и ферментмодифицирующую активности, на изменение содержания стрессовых метаболитов в растительной клетке. Последнее свидетельствует о способности лектинов выступать в качестве индукторов адапционных процессов корней проростков пшеницы [2, 3].

В результате проведенных исследований было показано, что при гипо-, гипертермии, засолении воздействие лектинов *A. brasilense* Sp7 (эпифит) и *A. brasilense* Sp245 приводило к максимальному возрастанию количества аскорбата после 60-минутной экспозиции с корнями проростков пшеницы. Для всех вариантов были одинаковы эффективные концентрации лектинов. Для лектина *A. brasilense* Sp7 максимум был отмечен при концентрации – 20 мкг/мл, для *A. brasilense* Sp245 при концентрации лектина – 10 мкг/мл. Комбинированное воздействие лектинов и смоделированной засухи приводило к максимальному повышению содержания аскорбата в корнях проростков пшеницы уже через 15 мин инкубации. В случае с лектином *A. brasilense* Sp7 наибольшее повышение было отмечено при концентрации лектина 20 мкг/мл. Для лектина эндофитного штамма максимальный эффект в отношении данных антиоксидантов был отмечен при концентрации – 5 мкг/мл. Во всех случаях лектины *A. brasilense* Sp7 и Sp245 обладали различной степенью активности., что, вероятно, связано с различиями в углеводной специфичности, структуре белков, и как следствие, неодинаковым взаимодействием с поверхностью растительной клетки, что является определяющим фактором для включения последующих этапов.

В связи с вышеизложенным, лектины азоспирилл можно отнести к регуляторам роста растений, обладающих как росторегулирующим, так и антистрессовым и иммуностимулирующим действием, что может явиться основой разработки технологии повышения продуктивности растений.

1. Bashan *et al.* (2004) *Can. J. Microbiol.* 50: 521–577.
2. Никитина. (2005) В: *Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями*. М.: Наука. 70–97.
3. Shelud'ko *et al.* (2009) *Microbiology*. 78: 696–702.

Микробные и растительные метаболиты и их влияние на другие организмы

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ ВИНА И КОЖИЦЫ ВИНОГРАДА НА БАКТЕРИИ *Escherichia coli*

Безматерных К.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Россия, Пермь
hydrargyrum@iegm.ru

Большой интерес исследователей к растительным полифенолам, в том числе полифенолам винограда и виноградных вин, связан с многочисленными данными об их положительном влиянии на здоровье человека и возможностью их использования при терапии заболеваний, причиной возникновения которых является окислительный стресс [1]. В основе антиоксидантного действия и влияния полифенолов на устойчивость клеточных культур млекопитающих и бактерий к стрессовым факторам может лежать способность этих соединений к связыванию радикалов и редокс-активных металлов, а также их модулирующее действие на редокс-статус клеток и активность стрессовых регулонов [2]. При этом в аэробных условиях многие редокс-активные соединения способны выступать в качестве прооксидантов, подвергаясь аутоокислению с образованием активных форм кислорода (АФК) [3]. Известно, что бактерии, обитающие в кишечнике, контактируют с относительно высокими концентрациями полифенолов и участвуют в их метаболизме [4]. Целью настоящего исследования было изучение анти- и прооксидантной активности экстрактов красного виноградного вина и экстракта кожицы красного винограда на бактерии *Escherichia coli*.

Для оценки прооксидантной активности экстрактов измеряли скорость продукции H_2O_2 в среде без бактерий. Наибольшую способность к аутоокислению ($881,1 \pm 13,6$ нмоль/мин·мг сух. веса) проявлял экстракт вина, по сравнению с которым экстракт виноградной кожицы был в 9 раз менее активен. Мониторинг экспрессии гена *katG*, кодирующего каталазу HPI, показал, что обработка бактерий экстрактами вина и кожицы винограда приводила к повышению экспрессии этого гена в 2,2 и 1,7 раза соответственно через 20 мин после добавления экстрактов в среду культивирования. Для количественной оценки антиоксидантной активности (АОА) экстрактов рассчитывали индекс АОА, равный отношению удельной скорости роста бактерий, предобработанных изучаемыми экстрактами, к удельной скорости роста без предобработки через 30 мин после добавления 2 mM H_2O_2 . Предобработка бактерий экстрактами вина и кожицы винограда значительно снижала бактериостатическое действие перекиси водорода, индекс АОА был 8,8 и 7,6 соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что антиоксидантная активность экстрактов, может быть в значительной мере опосредована их способностью к аутоокислению и индукции гена *katG*, что способствует снижению токсического действия H_2O_2 и ускорению ее деструкции каталазой. Результаты расширяют представления о молекулярных механизмах антиоксидантного действия биологически активных соединений растительного происхождения на бактерии *E. coli* и могут представлять интерес при разработке методов профилактики старения и комплексной терапии различных заболеваний.

1. Watson *et al.* Polyphenols in human health and disease. Academic Press, 2013. 1419 p.
2. López-Alarcón *et al.* (2013) *Anal. Chim. Acta.* 763: 1–10.
3. Halliwell. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.* 476(2): 107–112.
4. Espín *et al.* (2017) *Biochem. Pharmacol.* 139: 82–93.

*Работа выполнена в соответствии с государственным заданием 01201353246 и
поддержана грантом РФФИ № 19-44-590009 и грантом Президента РФ МК-3376.2018.4*

ГНИТЬ ИЛИ НЕ ГНИТЬ: ВОЙНА И МИР МЕЖДУ РАСТЕНИЯМИ И ФИТОПАТОГЕННЫМИ ПЕКТОБАКТЕРИЯМИ

*Горишков В.Ю., Петрова О.Е., Парфирова О.И., Исламов Б.Р., Церс И.Д., Гоголева Н.Е.,
Агеева М.В., Даминова А.Г., Губаев Р.Ф., Микишина П.В., Воробьев В.Н., Гоголев, Ю.В.*

Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

gvy84@mail.ru

Пектобактерий, возбудителей мягких гнилей растений, традиционно воспринимают как злостных вредителей, использующих «грубую силу» при колонизации хозяина. Эта сила выражается продукцией ферментов, разрушающих растительную клеточную стенку. Несмотря на внушительный наступательный арсенал, пектобактерии редко вызывают патологии. Практически вся продукция культурных растений контаминирована пектобактериями; при этом мягкие гнили развиваются далеко не всегда. В целом, взаимодействие этих патогенов и растений носит, в основном, не столько антагонистический, сколько мутуалистический характер.

Способов контроля мягких гнилей не существует, как и полностью иммунных к пектобактериям сортов. Информация по мягким гнилям, накопленная, в том числе в нашей лаборатории, свидетельствует, что попытка создания новых пестицидов и иммунных сортов вряд ли сможет препятствовать развитию этих заболеваний в связи с большим адаптивным потенциалом пектобактерий. При этом возможность контроля поведения патогена, а не попытка его уничтожения, может принести плоды для агропроизводства. Переход от силового действия в отношении паразита к дипломатической тактике имеет важное преимущество: последняя не накладывает селективного давления на патоген и поэтому не способствует появлению его новых высокоагрессивных форм. Для внедрения такого подхода необходимо четко представлять молекулярно-физиологические критерии агрессивного и неагрессивного «поведения» патогена *in planta*. Кроме того, поскольку «поведение» паразита во многом определяется совокупностью ответов хозяина, необходимо понимать физиологию всей интегрированной надорганизменной патосистемы при разных формах взаимодействия.

Этим научным проблемам посвящены наши исследования. Их методической основой является транскриптомное профилирование, позволяющее выявлять гены, продукты которых потенциально определяют характер (мутуалистический или антагонистический) развития патосистемы. Затем роли продуктов этих генов оцениваются нами с применением оригинальных тест-систем и множества различных подходов: нокаут и клонирование генов, различные виды хроматографии и микроскопии, ЯМР и т.д. Полученные результаты позволили нам, во-первых, выявить ранее не охарактеризованные детерминанты взаимодействия пектобактерий и растений и, во-вторых, получить представление о молекулярно-физиологических критериях, различающих мутуалистическую и антагонистическую формы взаимодействия.

Работа поддержана грантами РФФИ, МК и РНФ (№ 15-14-10022, 19-14-00194)

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ И БАКТЕРИЙ *A. brasilense* SP245 НА МИКРОРАСТЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Григорян М.А.¹, Ткаченко О.В.¹, Бурыгин Г.Л.^{1,2}, Евсеева Н.В.²

¹ Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
grigorian.mika@yandex.ru

Известно, что продуктивность растений картофеля зависит, с одной стороны, от генома растений, с другой от условий произрастания. Сорта различаются не только по устойчивости к стрессовым воздействиям, реакции на уровень питания, но и по содержанию фитогормонов, чувствительности к экзогенным регуляторам и инокуляции ассоциативными бактериями. Ассоциативные ростостимулирующие ризосферные азотфиксирующие бактерии, такие как *Azospirillum brasilense* Sp245, снабжают растения доступным азотом, фосфором и фитогормонами. Механизм ответных реакций растений на инокуляцию азоспириллами недостаточно ясен.

Целью исследования было изучение влияния бактерий *A. brasilense* Sp245 и экзогенной индолилуксусной кислоты на микрорастения картофеля в культуре *in vitro*.

В качестве исследуемого материала были использованы микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) десяти сортов из пересадочной коллекции кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ. Штамм *A. brasilense* Sp245 брали из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

Микрочеренки картофеля помещали на жидкую питательную среду Мурасиге-Скуга. Для каждого из сортов закладывали 5 вариантов опыта: 1) контроль; 2) инокуляция суспензией бактерий *A. brasilense* Sp245 в концентрации 10^6 клеток/мл питательной среды; 3) ИУК 1 мг/л; 4) ИУК 0,1 мг/л; 5) ИУК 0,01 мг/л.

Ранее нами было установлено, что азоспириллы не проявляют азотофиксирующей способности в культуре *in vitro* [1]. При этом бактерии *A. brasilense* Sp245 являются активными продуцентами ИУК. В результате инокуляции микрорастений азоспириллами ИУК накапливается как в питательной среде, так и в тканях растений. В данном исследовании наблюдалось ростостимулирующее влияние бактерий и ИУК по сравнению с контролем в первую очередь в отношении корневой системы. Возможно, именно ИУК обеспечивает ростостимулирующее влияние изучаемого штамма бактерий на растения картофеля. Анализ данных по сортам показывает существенную генотипическую зависимость проявления ростостимулирующего действия бактерий на растения.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов ассоциативных взаимодействий между растениями картофеля и азоспириллами, в том числе для изучения экспрессии генов, связанных с синтезом и редукцией ИУК в растениях, и участвующих в механизмах ответных реакций растений на инокуляцию бактериями.

1. Бойкова и др. (2015) *Аграрный научный журнал*. 7: 3–7.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 19-016-00116

ФИТОТОКСИНЫ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И ВОЗМОЖНЫЕ СПОСОБЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Далинова А.А., Дубовик В.Р., Канатова О.А., Рубижан А.В., Берестецкий А.О.

Всероссийский институт защиты растений, Россия, Санкт-Петербург
adalinova@vizr.spb.ru

Высокая засоренность полей приводит к значительным потерям урожая. В природе одним из естественных врагов сорных растений, контролирующих их численность, являются фитопатогенные грибы. Жизненная стратегия некротрофных фитопатогенов предполагает использование фитотоксинов для убийства растительных клеток. Эти метаболиты фитопатогенных грибов могут быть использованы в защите растений в рамках нескольких стратегий.

Фитотоксины фитопатогенных грибов, наряду с природными соединениями из других источников, можно рассматривать в качестве прообразов действующих веществ гербицидов. Зарубежными исследователями в качестве перспективных фитотоксинов рассматривались агликон аскаулитоксина из патогена мари белой *Ascochyta caulina* [1], теназоновая кислота и тентоксин – распространенные метаболиты грибов рода *Alternaria* [2] и другие.

Фитопатогенные грибы, поражающие сорные растения, могут быть использованы для контроля численности последних в рамках биогербицидной стратегии. При этом растения подвергаются высокой инфекционной нагрузке фитопатогена, что приводит развитию сильной локальной эпифитотии в популяции сорного растения [3]. На примере нескольких фитопатогенных грибов было показано, насколько важным является исследование биохимических основ инфекционного процесса. Например, основой препарата Phoma для борьбы с двудольными сорными растениями является гриб *Phoma macrostoma*, образующий фитотоксины семейства макроцидинов. Эти фитотоксины играют значительную роль в инфекционном процессе гриба, их содержание как в культуре микромицета, так и в препаративной форме биогербицида коррелирует с его эффективностью против двудольных растений. Таким образом, накопление макроцидинов можно рассматривать как критерий качества препарата [4]. Для инфекционной основы препарата Sarritor *Sclerotinia minor* важно образование щавелевой кислоты в процессе заражения растений-хозяев. Инфекционный материал, полученный при добавлении сукцината натрия в питательную среду, вызывает более сильное развитие некрозов листьев одуванчика, чем культура *S. minor*, полученная на среде без добавок [5].

Во Всероссийском институте защиты растений хранится коллекция фитопатогенных грибов, в том числе поражающих сорные растения. В результате скрининга были отобраны штаммы, перспективные для разработки биогербицидов против сорных растений, в частности, патогены осота полевого *Alternaria sonchi* S-102 и *Stagonospora cirsii* S-47. В рамках изучения биохимических основ вирулентности этих грибов был охарактеризован набор вторичных метаболитов, образуемых этими грибами на различных питательных средах. Из культуры *S. cirsii* были выделены фитотоксины стагонолид А, гербарумин I и С-7 эпимер гербарумина III, которые могут участвовать в патогенезе пятнистости листьев осота, а также проявляют перспективную гербицидную активность.

1. Duke *et al.* (2011) *Pest. Biochem. Physiol.* 100(1): 41–50.
2. Zhou *et al.* (2019) *Pest Manag Sci.*
3. Берестецкий (2017) *Вестник защиты растений* 1(91): 5–12.
4. Hubbard *et al.* (2014) *Sustain. Chem. Process.* 2:18.
5. Harding *et al.* (2015) *Front. Plant Sci.* 6:659.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-16-00085

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ГРИБА *Stagonospora cirsii* S-47 – ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА БИОГЕРБИЦИДА ДЛЯ БОРЬБЫ С ОСОТОМ ПОЛЕВЫМ

Дубовик В.Р.¹, Далинова А.А.¹, Петрова М.О.¹, Смирнов С.Н.², Иванов А.Ю.², Берестецкий А.О.¹

¹ Всероссийский институт защиты растений, Россия, Санкт-Петербург

² Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, Санкт-Петербург
xasevak@gmail.com

Гриб *Stagonospora cirsii* S-47 является патогеном осота полевого и рассматривается в качестве потенциального биогербицида для борьбы с этим сорным растением. Известно, что различные штаммы этого вида образуют вещества из группы 10-членных лактонов, в том числе фитотоксичные стагонолиды А и Н [1, 2]. Вторичные метаболиты *S. cirsii* S-47 представляют интерес как возможные факторы вирулентности, обеспечивающие эффективность биогербицида, а также как новые биологически активные вещества для медицины, ветеринарии и защиты растений. Цель исследования заключалась в выделении и оценке биологической активности вторичных метаболитов глубинной культуры *S. cirsii* S-47.

S. cirsii S-47 культивировали на модифицированной среде Чапека методом глубинного культивирования в ферментере в течение 6 суток. Экстракт из фильтрата культуральной жидкости получали методом твердофазной экстракции, фракционировали различными хроматографическими методами. Для идентификации выделенных соединений использовали методы масс-, УФ-, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа. Оценивали фитотоксическую, антимикробную, инсектицидную и цитотоксическую активности выделенных соединений.

Из экстрактов *S. cirsii* S-47 было выделено десять соединений, которые были идентифицированы как новые соединения стагохромены А (1), В₁ (2) и В₂ (3), стагонолиды J (4) и К (5), а также известные из литературы стагонолиды А (6) и Е (7) [1], гербарумин I (8) [3], курвулид А (9) и пиренолид С (10) [4, 5]. Соединения 1 – 6 и 8 в разной степени проявили фитотоксическую активность на надколотых листовых дисках растения-хозяина осота полевого. Соединения 4, 5 и 8 проявили токсичность в отношении злаковой тли, среди выделенных соединений только 6 проявил антимикробную активность в отношении *Bacillus subtilis* и *Candida tropicalis*. В опытах на неповрежденных листовых дисках осота полевого и растений различных семейств соединения 4, 5 и 8 проявили перспективную гербицидную активность.

Таким образом, *S. cirsii* S-47 при культивировании на жидкой питательной среде продуцирует набор биологически активных метаболитов, причем более половины выделенных веществ проявляют фитотоксическую активность на надколотых листовых дисках растения-хозяина. В дальнейшей работе будет оценена перспективность использования этих соединений в качестве прообразов новых средств защиты растений, а также будет изучен их механизм действия и возможное участие в патогенезе пятнистости листьев осота полевого.

1. Yuzikhin et al. (2007) *J. Agric. Food Chem.* 55: 7707–7711.
2. Evidente et al. (2008) *J. Nat. Prod.* 71: 31–34.
3. Rivero-Cruz et al. (2000) *Tetrahedron*. 56: 5337–5344.
4. Greve et al. (2008) *J. Nat. Prod.* 71: 1651–1653.
5. Nukina et al. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44(11): 2761–2762.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 16-16-00085

ГАЛОФИЛЬНЫЙ ПРОДУЦЕНТ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *Halomonas caseinilytica* EG33S7QL: ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И АКТИВНОСТЬ В ДЕГРАДАЦИИ НЕФТИ

Ибрахим И.М.¹, Коннова С.А.^{1,2}, Сигида Е.Н.², Федоненко Ю.П.^{1,2}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
ibrahim.egypt2016@yandex.ru

Микробные экзополисахариды (ЭПС) представляют высокий биотехнологический интерес для применения в медицине, косметологии, в пищевой, фармацевтической и нефтяной отраслях промышленности, а также при экологической биоремедиации почв, например, для связывания тяжелых металлов и радионуклидов и т.д. Выделение новых галофильных микроорганизмов из природной среды открывает возможности получения ЭПС с уникальным химическим составом и свойствами и перспективы их дальнейшего использования на засоленных территориях и акваториях [1].

В работе представлены результаты исследований продуцирующего ЭПС изолята EG33S7QL, выделенного из соленого озера Карун (Фаюм, Египет). Фенотипическая характеристика штамма EG33S7QL продемонстрировала, что он представлен граммотрицательными не формирующими споры подвижными палочковидными клетками. На плотных питательных средах бактерии формировали белые слизистые круглые колонии. Анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК штамма EG33S7QL позволил идентифицировать его как *Halomonas caseinilytica* (гомология 99%).

Штамм *H. caseinilytica* EG33S7QL проявлял способность к росту на минеральной среде в присутствии 10% NaCl, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии сырую нефть (1%). Степень утилизации сырой нефти составляла 68%.

Была проведена оптимизация условий культивирования штамма EG33S7QL. Максимальный выход биомассы был отмечен через 36 ч культивирования в среде SG при pH 10 (диапазон роста pH 6–10), 10% NaCl (рост в диапазоне концентраций NaCl 0–25%), при 30°C (рост в диапазоне температур 10–40°C), а также в присутствии 2% сахарозы. Максимальный выход ЭПС (3,4 г/л) был отмечен при росте на среде SG при использовании лактозы вместо сахарозы (2%).

Ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-Toyopearl 650M ЭПС был фракционирован на нейтральную и отрицательно заряженную фракции – ЭПС1 и ЭПС2 соответственно, которые различались по моносахаридному составу. Преобладающими моносахаридами в ЭПС1 являлись Glc и Gal (50,1 и 23,2%), в меньшем количестве выявлены GlcN, Man и GalN (10,7; 9,50 и 6,4%, соответственно). ЭПС2 содержал преимущественно Glc, Rha и GlcN: 49,1; 20,5 и 10,8%, соответственно, в меньшем количестве идентифицированы Gal, GalN, Man и Fuc: 7,0; 6,0; 4,5 и 2,1 %, соответственно. Эмульгирующая активность (E₂₄) ЭПС в отношении керосина и подсолнечного масла составила 78,6 и 73,7% соответственно.

Известно, что бактериальные ЭПС выполняют защитные функции, например, связывают катионы тяжелых металлов. Была исследована толерантность штамма *H. caseinilytica* EG33S7QL к присутствию тяжелых металлов в жидкой культуральной среде. Культура *H. caseinilytica* EG33S7QL показала высокую устойчивость к Cu (II), Pb (II) и Ni (II) в концентрации до 3 мМ. Zn (II) был наиболее токсичным для штамма (МИК, 2 мМ), тогда как Cd (II) был менее токсичным (МИК, 2,5 мМ). Увеличение концентрации тяжелых металлов коррелирует с уменьшением содержания ЭПС в культуральной среде, что, очевидно, влияет на выживаемость бактерий.

1. Decho *et al.* (2017) *Front. Microbiol.* 8: 922.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РОЛИ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ ПЕКТОБАКТЕРИЙ В ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАСТЕНИЯМИ

*Исламов Б.Р.¹, Горшков В.Ю.^{1,2}, Петрова О.Е.¹, Мишкина П.В.¹, Бурыгин Г.Л.³,
Воробьев В.Н.^{1,2}, Мандрик К.А.², Гоголев Ю.В.¹*

¹ Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

³ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
bah-islam80@mail.ru

Фитопатогенные бактерии *Pectobacterium atrosepticum* при взаимодействии с растениями формируют агрегаты, а также особые биопленко-подобные «многоклеточные» структуры, названные бактериальными эмболами, которые необходимы для колонизации сосудов ксилемы. Обычно формирование «многоклеточных» структур из бактериальных клеток, связано с образованием экстраклеточного матрикса, основным компонентом которого являются экзополисахариды (ЭПС). Однако ЭПС пектобактерий до наших исследований не были описаны. В связи с этим, целью данной работы было получить препарат ЭПС пектобактерий, расшифровать молекулярную структуру полимера и выяснить роль ЭПС во взаимодействии пектобактерий с растениями.

Внеклеточные полисахариды выделяли из бесклеточных супернатантов голодающих культур и фракционировали с помощью гель-проникающей хроматографии. Всего было выявлено две основные фракции полимеров с молекулярными массами от 100 до 800 кДа и менее 50 кДа. Мы акцентировали своё внимание на доминирующей фракции полимеров (100-800 кДа). Для установления структуры регулярного звена ЭПС были проанализированы одномерные (¹H, ¹³C, ¹³C JMOD), двумерные гетероядерные (HSQC, HMBC) и гомоядерные (COSY, TOCSY, ROESY) ЯМР-спектры. Регулярное звено ЭПС представляет собой пентасахарид, остов которого состоит из остатков α-галактопиранозы, α-маннопиранозы и α-рамнопиранозы, соединенных 1,2 и 1,4 типами связи, соответственно. К α-маннопиранозильному остатку в положении О-3 присоединена боковая цепь, включающая α-галактопиранозу и 10-и-углеродный разветвленный моносахарид эрвиниозу, соединенные 1,3-связью.

На доминирующую фракцию ЭПС пектобактерий нами были получены специфичные поликлональные антитела, с помощью которых мы продемонстрировали, что ЭПС синтезируются в растении-хозяине во время формирования бактериальных эмболов.

Используя динамическое рассеяние света и вискозиметрию, нами было показано, что ЭПС влияет на реологию водных растворов и увеличивает вязкость жидкостей. Существует определенная «критическая» концентрация ЭПС, при которой происходит достаточно резкое увеличение вязкости растворов этого полимера. При этом увеличение вязкости связано с формированием устойчивых агрегатов молекул ЭПС.

Нами было также показано, что ЭПС пектобактерий могут осуществлять детоксикацию АФК, которые активно образуются во время инфекции. Добавление ЭПС снижало интенсивность окисления салицилата натрия в ходе реакции Фентона. Кроме того, мы выяснили, что ЭПС не принимают участия в качественном, вертикальном иммунитете: они и не индуцируют, и не блокируют эту форму иммунного ответа.

Таким образом, в нашем исследовании впервые выявлены экзополисахариды пектобактерий и определена их молекулярная структура. Показано, что эти полимеры могут выполнять протекторную функцию, защищая клетки от активных форм кислорода, а также структурную, создавая благоприятные условия для колонизации сосудов повышением вязкости ксилемного сока. При этом ЭПС достаточно инертны для защитных систем растения, поскольку не вызывают сильного иммунного ответа, что часто бывает характерно для экстраклеточных метаболитов фитопатогенов.

ГАЛОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ПРОДУЦЕНТЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Коннова С.А.^{1,2}

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
konnovasa@yandex.ru

Галофильные микроорганизмы активно развиваются в экосистемах, где концентрации соли во много раз превышают таковые в Мировом океане. Они встречаются в соленых озерах, почвах солончаках на всех широтах, а также в искусственных солнечных прудах-испарителях. В зависимости от концентраций соли, оптимальных для роста галофильных микроорганизмов, их разделяют на: слабые или умеренные (конц. NaCl 3–15%); пограничные экстремальным (конц. NaCl 9–24%); экстремальные (конц. NaCl 15–31%) галофилы. Существуют микроорганизмы – галотолерантные, которые не имеют потребности в соли для роста, но могут адаптироваться к концентрациям выше 15% NaCl.

Среди галофильных микроорганизмов в разной степени представлены фотосинтезирующие, литотрофные и гетеротрофные бактерии, фотосинтетические и гетеротрофные эукариоты гетеро-, фото- и метанобразующие археи. Многие галофилы являются продуцентами физиологически активных соединений, таких как внеклеточные гидролазы, каротиноиды, бактериородопсин, полигидроксиалканоаты, галоцины, биосурфактанты, экзополисахариды (ЭПС). При этом использование высокосолёных сред снижает возможность контаминации, что делает галофильные микроорганизмы удобным объектом для биотехнологии.

Одним из факторов адаптации галофильных бактерий к существованию в высокозасоленных средах является продукция ЭПС, которые служат эффективным защитным барьером от действия неблагоприятных физических и химических факторов, защищают от высыхания, тяжелых металлов и других токсикантов. Состав и химическая структура ЭПС очень разнообразны: они гомо- или гетерополисахариды, содержащие также различные органические и неорганические заместители. Кроме защитной функции они участвуют в процессе адгезии к биологическим и инертным поверхностям, в процессах агрегации между клетками и в формировании биопленок; помогают выживать при нехватке питательных веществ.

Экстремальные места обитания являются источником для получения уникальных продуцентов полисахаридов с технологически полезными свойствами для медицины, фармацевтики, пищевой, косметической и нефтяной промышленности, где требуются эмульгирующие, загущающие, суспендирующие и хелатирующие агенты. Микробные ЭПС имеют широкое применение в биотехнологии. Например, на сегодняшний день многие виды семейства Halomonadaceae описаны как производители больших количеств ЭПС, обладающих высокой вязкостью, псевдопластичностью, способностью к флокуляции [1]. Штаммы рода *Bacillus* продуцируют гомополимер фруктозы – леван, который хорошо растворим в воде и обладает противоопухолевой и противовоспалительной активностью, применяется в пищевой промышленности, медицине и производстве косметических средств [2]. В докладе будут представлены и другие сведения о структурных особенностях и потенциале ЭПС, продуцируемых галофилами.

1. Llamas *et al.* (2011) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2508–2514.

2. Mishra *et al.* (2013) In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 179–192.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИТОВ РИЗОБАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas* НА РАСТЕНИЯ ТОМАТА

Дрозд Е.В., Лагодич О.В.

Белорусский государственный университет, Беларусь, Минск
lagodichov@gmail.com

Томаты занимают первое место в мире по производству среди овощных культур, как в открытом грунте, так и в теплицах. Потери урожая томатов вследствие поражения различными заболеваниями могут достигать 60%, поэтому очень важными являются мероприятия по профилактике заболеваний и защите растений. К таким мероприятиям можно отнести использование ризосферных бактерий (PGPR), которые запускают у растений индуцированную системную устойчивость (ISR). Данные бактерии синтезируют различные метаболиты – сидерофоры, феназиновые антибиотики, полисахариды и др., которые служат индуцирующими агентами (элисителями) [1]. Поэтому очень важным является изучение способности метаболитов ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* активизировать защитные свойства растений томата и улучшать их ростовые качества.

В работе были использовали *P. fluorescens* BKMB 561, *P. aurantiaca* B-162, а также мутантный вариант *P. aurantiaca* *phz*⁻ [2, 3].

Для моделирования системы заражения патогеном использовали споры гриба *Botrytis cinerea* Pers, которые получали путем смыва с чашки с трехнедельным спороносящим мицелием. Объектом исследования служили томаты сорта «Перемога 165».

Семена проращивали в культуре *in vitro* на безгормональной среде Мурасиге-Скуга, с последующим добавлением внеклеточных метаболитов ризобактерий. На стадии четырех настоящих листьев, на первый настоящий лист наносили суспензию спор *B. cinerea*.

Спустя 7-10 дней после заражения на растениях, обработанных внеклеточными метаболитами ризобактерий *P. fluorescens* и *P. aurantiaca*, отмечались незначительные участки поражения грибом или таковые отсутствовали вовсе. В то время как на контрольных растениях (ничем не обработанных) и растениях, обработанных культуральной жидкостью *P. aurantiaca* *phz*⁻, поражения серой гнилью охватывало до 30-40% площади листовой пластинки.

Через две недели после заражения были оценены морфометрические параметра растений, такие как длина и масса. Было показано, что наибольшая прибавка длины стебля и корня зафиксирована после обработки семян томатов внеклеточными метаболитами *P. fluorescens* BKMB 561, а наименьшая у контрольных растений (не подвергавшихся обработке). Растения же, зараженные спорами фитопатогена, имели меньшие показатели длины стебля, корня и массы растений, по сравнению с растениями контрольной группы.

Полученные результаты показали, что добавление к растениям томатов культуральной жидкости бактерий рода *Pseudomonas* оказывает ростостимулирующий эффект, однако ярко выраженный защитный эффект показали бактерии, способные к синтезу ИУК, гиббереллинов, антибиотиков феназинового ряда, что может говорить о способности данных метаболитов индуцировать системную устойчивость у растений томатов.

1. Лагодич и др. (2012) *Труды БГУ*. 7: 182–187.
2. Феклистова. (2005) *Вестник БГУ*. 2: 66–69.
3. Кулешова и др. (2011) *Труды БГУ*. 6: 224–230.

РОЛЬ ЭФФЕКТОРОВ T3SS В СТРАТЕГИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ ПАТОГЕН-ХОЗЯИН

Ляпина А.М.¹, Хижнякова М.А.¹, Мотин В.Л.², Федорова В.А.¹

¹ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, Россия, Саратов

² University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

lyapina_anna@inbox.ru

Патогенные бактерии используют множество стратегий для успешной колонизации макроорганизма. Одной из ключевых является активный транспорт белков через фосфолипидные мембраны (секреция). Секретируемые белки выполняют значительное число функций: от участия в построении клеточных мембран и филаментов, до промоутинга вирулентности и непосредственной интоксикации таргетных клеток, в том числе, осуществляющих иммунную защиту хозяина. В целом, дизайн строения секреторных систем бактерий определяется необходимостью преодолевать одну, две или три фосфолипидные мембраны, две из которых бактериальные и одна – мембрана хозяйской эукариотической клетки. К последнему варианту относится система секреции III типа (Type 3 Secretion System, T3SS), широко распространенная у грамотрицательных бактерий, патогенных для человека, животных и растений.

T3SS представляет собой «инъектисому» – иглоподобную структуру, приспособленную для секреции ряда эффекторных белков, число которых варьирует у разных видов. У патогенных представителей рода *Yersinia* T3SS транслоцирует внутрь хозяйской клетки как минимум 6 эффекторов, именуемых Yops (*Yersinia* Outer Proteins): YopE, YopM, YopO/YpkA, YopP/J, YopT и YopN. Инъецируемые белки структурно и функционально схожи с эукариотическими факторами трансдукции, что позволяет бактериальным эффекторам нарушать нормальный внутриклеточный сигналинг. Результатом активности Yops является дезинтеграция актинового цитоскелета, ингибирование фагоцитоза и воспалительного цитокинового ответа, а также индукция апоптоза таргетных клеток макроорганизма. Эти функции делают эффекторы T3SS ключевым фактором вирулентности иерсиний. В то же время, возможность запуска врожденного и гомологичного протективного адаптивного иммунного ответа была продемонстрирована в ряде исследований на клеточных линиях и лабораторных животных.

В нашей работе на модели вакциноиндуцируемого иммунитета изучается роль YopE и YopM, эффекторов T3SS возбудителя чумы *Y. pestis*, в формировании специфического адаптивного иммунного ответа. Показано участие обоих белков в индукции гуморальных и клеточных иммунных реакций с образованием детектируемого уровня гомологичных антител и выраженной Th1-поляризацией клеточного ответа. Полученные данные позволяют прояснить двойственную роль эффекторов системы секреции III типа в стратегии взаимодействия патогена с хозяином, а также демонстрируют способность макроорганизма эффективно им противодействовать, что открывает перспективы для разработки средств специфической профилактики и идентификации коррелятов протекции при заболеваниях, вызываемых иерсиниями.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-016-00159

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ФОСФОНАТЫ КАК ДЕТЕРМИНАНТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИТОПАТОГЕНА *Pectobacterium atrosepticum* С РАСТЕНИЕМ

Парфирова О.И.^{1,2}, Горшков В.Ю.^{1,2}, Тарасова Н.Б.¹, Гоголева Н.Е.^{1,2}, Смолочкин А.В.³,
Петрова О.Е.¹, Гоголев Ю.В.^{1,2}

¹ Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань

³ Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, Россия,
Казань
parfirovaolga.i@gmail.com

Пектобактерии являются причиной развития мягкой гнили растений, которая приводит к потере урожая по всему миру. Обычно пектобактерий рассматривают как патогенов, применяющих агрессивную тактику в отношении хозяина. Однако эти микроорганизмы также реализуют и более «щадящую» стратегию взаимодействия с растениями, позволяющую мирно сосуществовать патогену с хозяином. Важная задача состоит в поиске молекулярных игроков, определяющих тип инфекции (типичная манифестная или латентная), вызываемых пектобактериями.

С помощью транскриптомного анализа мы выяснили, что одним из критериев агрессивного «поведения» *Pectobacterium atrosepticum* является сверхэкспрессия генов, аннотированных как кодирующие ферменты биосинтеза фосфонатов – соединений, в которых есть связь «углерод-фосфор». Известно, что кроме фосфонатов, входящих в структуру макромолекул, в природе широко распространены низкомолекулярные фосфонаты. Для ряда низкомолекулярных фосфонатов продемонстрированы бактерицидные и гербицидные свойства. Однако ранее эти соединения у пектобактерий описаны не были.

Для проверки способности пектобактерий продуцировать экстраклеточные низкомолекулярные фосфонаты нами были подобраны условия *in vitro*, при которых у бактерий индуцируется экспрессия генов, кодирующих ферменты биосинтеза фосфонатов. Затем мы проводили экстракцию предполагаемых низкомолекулярных фосфонатов из супернатантов культур пектобактерий. С помощью ЯМР-спектроскопии в препаратах супернатантов культур нами были детектированы сигналы в области 21 мд, соответствующие фосфонатам, и в области 59 мд, соответствующие фосфониевым солям. В рамках наших исследований, с помощью направленного мутагенеза мы получили форму пектобактерий, дефектную по гену одного из ферментов биосинтеза фосфонатов – фосфоенолпируват фосфомутазы *Fom1*. При анализе супернатантов культур мутантного $\Delta fom1$ штамма с помощью ЯМР-спектроскопии мы не выявили сигналов, соответствующих фосфонатам; но при этом сигнал, соответствующий фосфониевым солям присутствовал. Это, по всей видимости, свидетельствует о разных путях биосинтеза низкомолекулярных фосфонатов и фосфониевых солей. В настоящее время мы проводим сравнительный анализ стратегии взаимодействия растений с дикой и $\Delta fom1$ -мутантной формой *P. atrosepticum*.

Таким образом, впервые для пектолитических бактерий нами были обнаружены низкомолекулярные фосфонаты, которые, по всей вероятности, служат в качестве детерминант агрессивности этих фитопатогенов.

Работа поддержана грантом РНФ №19-14-00194

ОСОБЕННОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОТНОШЕНИИ ЖИВОТНЫХ КЛЕТОК

Пылаев Т.Е., Величко Н.С., Авдеева Е.С.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
pylaev_t@ibppm.ru

Микробиологические исследования почвы в течение последних десятилетий были направлены, прежде всего, на всесторонние исследования ассоциативных микроорганизмов. Рассматриваемыми вопросами были такие как, как микроорганизмы и плодородие почвы, микроорганизмы как основа биологических методов борьбы с заболеваниями растений, микроорганизмы как источники биологически активных веществ – стимуляторов роста растений. Результаты фундаментальных исследований легли в основу практических рекомендаций для создания комплексных препаратов на основе консорциума ризосферных микроорганизмов. Помимо многочисленных работ по изучению свойств ризобактерий, в том числе, проводимых в ИБФРМ РАН более 30 лет, популярны проблемы фитопатогенеза симбиотических микроорганизмов. Однако практически неизученными остаются вопросы о потенциальных угрозах, возникающих при системном введении ризосферной микробиоты в агроценозы, для организмов человека и животных. На наш взгляд, оценка рисков крайне важна на этапе перехода от фундаментальных исследований к практической реализации любой биотехнологической платформы.

В докладе рассмотрены существующие методические приемы для оценки токсических эффектов ризобактерий на организмы животных в лабораторных условиях в системах *in vitro* и *in vivo*. Предложены оригинальные и простые подходы для адаптации общепринятых тестов, позволяющих определить ряд количественных и качественных цитотоксических показателей, на моделях животных клеток. Определены цитотоксические эффекты целых клеток и отдельных поверхностных гликополимеров бактерий рода *Herbaspirillum* в отношении двух модельных линий клеток HeLa (опухолевые) и Vero (неопухолевые). Выявлена корреляция между эколого-морфологическими особенностями отдельных штаммов изученных микроорганизмов и проявляемыми ими цитотоксическими свойствами.

В заключение отметим, что предложенные нами методические приемы могут быть полезными как в фундаментальном плане, при изучении ризоценозов, так и в практическом – как основа общих рекомендаций при продвижении препаратов на основе консорциумов ризобактерий.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РНФ № 17-74-10090

ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ РОДА *Azospirillum* КАК ИНДУКТОРЫ РЕАКЦИЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У РАСТЕНИЙ

Самсонова Е.А.^{1,2}, Сигида Е.Н.¹, Федоненко Ю.П.^{1,2}, Коннова С.А.^{1,2}

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.

Чернышевского, Россия, Саратов

elena.smsnv@mail.ru

Ризосфера является средой обитания множества микроорганизмов, в том числе патогенных и симбиотических (ассоциативных). Липополисахариды – преобладающие компоненты мембраны грамотрицательных бактерий – являются сигнальными молекулами (элиситорами), запускающими ряд ответных реакций в растениях. Сочетание этих реакций может приводить к развитию индуцированной системной устойчивости, которая активизирует защитные системы растений и включает механизмы биологического контроля. К настоящему моменту известно несколько сигнальных путей, которые запускаются в растениях (на примере *Arabidopsis*) в ответ на присутствие ЛПС, однако эти реакции изучены преимущественно для фитопатогенов [1], при этом роль ЛПС симбиотических бактерий, в том числе модельных ассоциативных микроорганизмов рода *Azospirillum*, в индукции защитных реакций у растений остается не выявленной.

Целью работы являлось исследование влияния ЛПС *A. brasilense* Sp7 на продукцию перекиси водорода и активность пероксидазы в проростках пшеницы (сорт Саратовская 43). Зерновки стерилизовали диоксидом, проращивали в чашках Петри в течение 2 дней, после чего в стерильных условиях переносили в емкости с синтетической питательной средой для растений, содержащей ЛПС (10, 50, 100, 250 и 500 мкг/мл), и выращивали при 25°C в течение 1–4 суток. В качестве контроля использовали растения, выращенные в среде без ЛПС. Определение пероксидазы и пероксида водорода в экстрактах растений осуществляли колориметрическими методами.

Анализ полученных данных позволил установить, что к 4-м суткам культивирования, вне зависимости от концентрации ЛПС, в стеблях и корнях проростков пшеницы происходили незначительные колебания содержания пероксида водорода. Культивирование в присутствии ЛПС также незначительно влияло на активность пероксидазы в стеблях, тогда как в корнях растений, выращенных в присутствии ЛПС в концентрации 100 мкг/мл и выше, ее концентрация существенно возрастала. Таким образом, получены предварительные данные об участии ЛПС *A. brasilense* Sp7 в активации окислительного стресса в проростках пшеницы.

1. Newman *et al.* (2013) *Front. Plant Sci.* 4: 139.

Работа поддержана грантом РНФ (18-74-00060)

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *Azospirillum rugosum* DSM-19657

Сигида Е.Н.¹, Кокоулин М.С.², Дмитренко П.С.², Гринев В.С.^{1,3}, Федоненко Ю.П.^{1,3},
Коннова С.А.^{1,3}

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов

² Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН, Россия,
Владивосток

³ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г.
Чернышевского, Россия, Саратов
sigida_e@ibppm.ru

Грамотрицательные альфапротеобактерии рода *Azospirillum* из семейства Rhodospirillaceae являются типичными представителями ризосферы диких и культивируемых злаков. На сегодняшний день род *Azospirillum* включает 22 вида, большинство из которых способны увеличивать урожайность растений, оказывая множественное воздействие на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Рост-стимулирующий потенциал азоспирилл реализуется посредством продукции фитогормонов, улучшения минерального питания, фиксации атмосферного азота, снижения биотических и абиотических стрессов, биоконтроля патогенов и других механизмов. В начальные этапы формирования растительно-микробных ассоциаций с участием азоспирилл вовлечены гликополимеры бактериальной поверхности – липополисахариды (ЛПС). Стимулирующий эффект, оказываемый азоспириллами на растения, является весомой причиной для изучения молекулярного механизма ассоциативного взаимодействия и требует детального изучения структуры ЛПС.

Из сухой биомассы бактерий *A. rugosum* DSM-19657 водно-фенольной экстракцией был выделен ЛПС, в результате деградации которого в мягких кислых условиях были получены ОПС и липид А. Моносахаридный анализ ОПС в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ выявил наличие Rha, Glc, GlcN и Fuc3N в соотношении ~4.9 : 2.4 : 1.4 : 1. Анализ продуктов полного гидролиза ОПС методом ГЖХ в виде ацетилированных (S)-2-октигликозидов позволил установить D конфигурацию Glc и GlcN и L конфигурацию Rha.

Учитывая схожесть моносахаридного состава ОПС *A. rugosum* и *A. brasilense* Jm125A2 [1], мы провели сравнение 1D и 2D ЯМР спектров ОПС этих штаммов. В результате сравнения была выявлена практически полная идентичность мажорных серий сигналов в спектрах, что свидетельствовало об идентичности повторяющихся звеньев ОПС.

В составе липида А методом ГЖХ МЭЖК были выявлены преобладающие 14:0 (3-ОН), 16:0 (3-ОН) и 18:1 кислоты, на долю которых приходилось более 85% от суммы идентифицированных жирных кислот. Также были обнаружены 16:0 (11%), 16:1 (2%) и 19:0 (1%) кислоты. Природа О-связанных жирных кислот была установлена с применением мягкого щелочного гидролиза в 12.5% NH₄OH, в условиях которого эфирсвязанные ацильные и ацилоксиацильные группы менее устойчивы, по сравнению с амидосвязанными ацилами и ацилоксиацилами. В результате О-деацилирования наблюдалось снижение содержания 14:0 (3-ОН) по отношению к другим кислотам, что свидетельствовало о том, что данная кислота является первичной эфирсвязанной, а вторичные кислоты ацилируют амидосвязанную 16:0 (3-ОН). Методом ГЖХ ацетилированных метилгликозидов в составе липида А были идентифицированы GlcN и GalA в соотношении ~2 : 1.

На основании комплексного анализа химического состава и МАЛДИ масс-спектров была установлена структура липида А *A. rugosum*, который представляет собой смесь пента-, тетра- и триацильных типов, отличающихся друг от друга количеством остатков первичной О-связанной 14:0(3-ОН). Микрогетерогенность в пределах каждого из типов липида А с разной степенью ацилирования, обусловлена природой вторичных жирных кислот, ацилирующих остаток N-связанной 16:0(3-ОН) дистального кольца GlcN.

ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ, И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Сидорова Д.Е.¹, Падий Д.А.², Плюта В.А.¹, Хмель И.А.¹

¹ Институт молекулярной генетики РАН, Россия, Москва

² Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Россия, Москва
misenok1@gmail.com

В последние годы все больший интерес стали вызывать летучие органические соединения (ЛОС), синтезированные бактериями, а также их значимость в жизнедеятельности других микроорганизмов и во взаимодействии с высшими организмами. Уже первые исследования продемонстрировали, что бактерии с помощью выделяемых ЛОС способны влиять на процессы жизнедеятельности фитопатогенных организмов (бактерии, грибы, насекомые), а также стимулировать защитные реакции растений. Выяснилось, что многие летучие вещества проявляют антимикробное действие, что можно успешно использовать в сельском хозяйстве, а также в ряде других отраслей (медицина, пищевая промышленность, производство строительных материалов). Кроме того, было показано, что ЛОС функционируют как сигналы дистанционной коммуникации нового типа между различными организмами («infochemicals»).

Целью настоящей работы является изучение биологической активности ЛОС с разной химической структурой, синтезируемых бактериями разных таксономических групп: спирты (изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол), кетоны (2-бутанон, 2-пентанон, 2-октанон, бета-ионон – ненасыщенный кетон), терпены (лимонен и α -пинен). Объектами исследований являются: фитопатогенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens* и грибы *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia oryzae*, *Verticillium dahliae*, модельное растение *Arabidopsis thaliana*, плодовые мушки *Drosophila melanogaster*.

Обнаружено, что 2-октанон и изоамиловый спирт оказывали наиболее сильное ингибирующее действие на *A. tumefaciens*, слабее действовали 2-бутанон, 2-пентанон и 2-фенилэтанол, и практически не действовали -ионон и лимонен. Изученные ЛОС оказывали фунгистатическое действие на рост мицелия фитопатогенных грибов, самое сильное действие наблюдалось в присутствии 2-октанона, изоамилового спирта и 2-фенилэтанола. ЛОС также нарушали спорообразование исследуемых грибов и влияли на их морфологию.

ЛОС тормозили прорастание семян *A. thaliana*, а также оказывали действие на зрелые растения. Наиболее сильное действие оказывал изоамиловый спирт, 2-фенилэтанол, β -ионон и лимонен. Семядольные листики в присутствии подавлявших прорастание семян ЛОС теряли свою зеленую окраску, по-видимому, в результате нарушения синтеза хлорофилла или его деградации, их размеры, а также размеры корешков были меньше, чем в контрольном варианте. Наиболее слабое действие оказывал α -пинен.

Мушки *Drosophila melanogaster* погибали быстрее всего в присутствии лимонена и α -пинена, которые не демонстрировали такого явного действия в опытах с другими объектами. При увеличении количеств других ЛОС насекомые также погибали.

Таким образом, в результате выполнения работ получены новые данные о биологической активности ЛОС разной химической структуры, синтезированных бактериями, исследования продолжаются.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ № 18-34-00396-мол_а и 18-04-00375-а

СПОСОБНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ ПРОДУЦИРОВАТЬ АБСЦИЗОВУЮ КИСЛОТУ

Сырова Д.С., Шапошников А.И., Макарова Н.М., Гагкаева Т.Ю., Храпалова И.А.,
Емельянов В.В., Гоголев Ю.В., Ганнибал Ф.Б., Белимов А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии,
Россия, Санкт-Петербург
imperial_phoenix@ro.ru

Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) играет значительную роль во многих физиологических процессах и реакции растений на абиотические и биотические стрессоры [1]. Фитопатогенные грибы также продуцируют АБК, но роль этого признака во взаимодействиях с растениями-хозяевами плохо изучена [1, 2, 3]. Данная работа была направлена на скрининг коллекционных штаммов различных фитопатогенных грибов на способность синтезировать АБК, чтобы найти новые виды с данным свойством, а также найти корреляцию между этим свойством и их характеристиками. В этой работе был проведен скрининг 65 коллекционных штаммов фитопатогенных грибов различных таксонов (13 родов, 26 видов) по способности продуцировать АБК в периодической культуре с использованием модифицированной картофельной (MPD) и оригинальной искусственной (OCD) сред. Анализ содержания АБК проводили с помощью ультраэффективной жидкостной хроматографии. Тридцать четыре штамма, принадлежащие к 13 видам, продуцировали АБК на среде MPD, и среди них девятнадцать штаммов также продуцировали АБК на среде OCD. Максимальная концентрация АБК была обнаружена в культуральной жидкости штамма *Apiospora montagnei* MF-R13.8 ($56,5 \pm 0,1$ мкг/л), а штамм MF-S41.5 того же вида, который был самым активным продуцентом на среде OCD ($13,4 \pm 1,1$ мкг/л).

Впервые АБК была обнаружена у видов *Alternaria tenuissima*, *Apiospora montagnei*, *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium avenaceum*, *F. solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* и *Sclerotium varium*. Не обнаружено корреляции между способностью продуцировать АБК и растением-хозяином, органом растения, из которого был изолирован гриб, или регионом происхождения штамма. Это свидетельствовало о сложной роли биосинтеза грибной АБК и вовлеченности многих свойств грибов в патогенез.

В условиях агаровой культуры три сорта томатов инокулировали штаммами *Fusarium solani* или *F. oxysporum*, отличающимися по продукции АБК *in vitro*. Как правило, продуцирование АБК не коррелировало с эффектами грибов на корни томатов, за исключением отрицательной корреляции продукции АБК штаммами *F. solani* с длиной корней сорта Ailsa–Craig. Эти результаты дали новую оригинальную информацию о роли синтезированной грибами АБК в качестве положительного модулятора патогенеза. Отобранные штаммы, продуцирующие АБК, могут быть использованы для изучения механизмов, лежащих в основе участия грибной АБК в растительно-микробных взаимодействиях.

1. Endo *et al.* (2014) In: *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. Dordrecht: Springer Netherlands, 23–25.
2. Akbar *et al.* (2018) *PLoS One*. 13 (9).
3. Asselbergh *et al.* (2008) *Mol. Plant-Microbe In.* 21(6): 709–719.
4. Audenaert *et al.* (2002) *Plant Physiol.* 128(2): 491–501.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ

Тимуш И.Н.

Институт Микробиологии и Биотехнологии АНМ, Молдова, Кишинев
timus_ion@mail.ru

С использованием наноматериалов и нанотехнологий открылись новые возможности биотехнологии. На сегодняшний день наноматериалы и нанотехнологии находят применение практически во всех отраслях. Одним из перспективных направлений создания экологически безопасных средств защиты и стимуляторов роста для растений являются нанотехнологии. Поскольку наночастицы обладают высокой реакционной активностью и способностью к диффузии сквозь биологические мембраны, преодолению тканевых барьеров, они могут оказывать токсическое воздействие на клетки при ослаблении функций основных компонентов клеточной структуры, таких как митохондрии, ядро и ДНК. Повреждающее воздействие наночастиц на клетки зависит от многих факторов: химического состава, концентрации, времени экспозиции и т.п. [1]

Целью исследования было изучение антимикробной активности микромицетов, культивируемых в присутствии наночастиц.

В опытах использовали 11 штаммов мицелиальных грибов из Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов, принадлежащих к р. *Trichoderma* (5 штаммов) и *Penicillium* (6 штаммов). Культуры были выращены на агаризованной среде Чапека с добавлением наночастиц в концентрации (%) Co – 0,0001, Cu, ZnO, Fe₂O₃, Fe₂ZnO₄ и Fe₂CuO₄ – 0,001. Контролем служили варианты со средой Чапека без наночастиц. Наночастицы Co, Cu ZnO были синтезированы и предоставлены сотрудниками из Юго-Западного Государственного Университета (г. Курск, Россия), а наночастицы Fe₂O₃, Fe₂ZnO₄ и Fe₂CuO₄ – из Института Химии Молдовы. Размер наночастиц (НЧ) разный (нм): НЧCo – 15-20; НЧCu – 2-3; НЧZnO 20-30; НЧFe₂O₃ – 7-10; НЧFe₂ZnO₄ – 10-17 и НЧFe₂CuO₄ – 30-50.

Антифунгальную активность определяли методом агаровых блоков [2]. В опытах был использован спектр из 5 штаммов фитопатогенных грибов: *Aspergillus niger*; *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*; *Fusarium oxysporum* – возбудителей болезней сельскохозяйственных растений, часто встречающихся в Молдове.

При анализе результатов проведенных исследований была обнаружена возможность повышения антифунгальной активности по отношению к тому или иному фитопатогену, варьируя состав среды добавлением наночастиц. Замечено, что, например, для активации штамма рода *Trichoderma* и повышения антифунгальной активности по отношению к такому широко распространенному фитопатогену как *Alt. alternata* лучше всего вести культивирование на среде с добавлением наночастиц Fe₂ZnO₄, т.к. практически у всех штаммов происходит увеличение антифунгальной активности на 10,5-28,3% по сравнению с контролем, а к *F.oxysporum* – наночастиц Fe₂ZnO₄ или Fe₂CuO₄, т.к. было замечено увеличение размера зон задержки роста этого тест-фитопатогена на 12,6-39,2 % у некоторых представителей рода *Trichoderma*. Повышение антифунгальной активности у представителей р. *Penicillium*, как показали результаты экспериментов, также в большинстве вариантов опытов было замечено при добавлении в среду Fe₂ZnO₄ и Fe₂CuO₄: диаметр зон задержки роста таких фитопатогенов как *Alt. alternata*, *F. solani* превышал значения контроля на 18,0–53,1%.

Таким образом, можно сделать вывод, что добавлением наночастиц в среду культивирования микромицетов можно повысить их антифунгальную активность.

1. Туранская и др. (2013) *Поверхность*. 5(20): 227–246.
2. Егоров. (2004) М. Наука, 2004, с. 577.

РИЗОБАКТЕРИИ *Paenibacillus polymyxa* 92 И ИХ МЕТАБОЛИТЫ ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПРОРОСТКАМИ ПШЕНИЦЫ

Трегубова К.В., Егоренкова И.В.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
kristreva@gmail.com

Все более активное применение биопрепаратов на основе ростстимулирующих бактерий не только положительно сказывается на урожайности культурных растений, но и оказывает большой оздоравливающий эффект на экологическую обстановку. Внимание к ризобактериям *Paenibacillus polymyxa* как к потенциальным регуляторам роста и развития растений существенно выросло за последние годы в виду обнаружения у них ряда агрономически ценных признаков, среди которых – способность к фиксации азота, синтезу ряда биологически активных веществ: фитогормонов, антибиотиков, ферментов, экзополисахаридов (ЭПС) и фосфатсолубилизирующая активность [1, 2].

Объектом исследования служил штамм *P. polymyxa* 92 (VNIISHM 92), изолированный из корней пшеницы Ю.М. Возняковской (ВНИИСХМ, г. С.-П., г. Пушкин). Цель работы состояла в выявлении у данных бактерий свойств, значимых для формирования эффективной ассоциации с растениями.

С использованием комплекса микробиологических и биохимических методов исследования было обнаружено, что штамм *P. polymyxa* 92 обладал такими свойствами, как способность к синтезу антибактериальных веществ, фитогормонов (ИУК), ЭПС. При культивировании на плотных и жидких питательных средах со специфическими субстратами у данного штамма установлена высокая активность внеклеточных литических ферментов: протеаз, амилаз, целлюлаз, хитиназ, глюкозидаз, липаз. Наблюдалась примерно одинаковая высокая способность гидролизовать пектины, полученные из различных источников сырья: свекловичный, цитрусовый и яблочный. На плотных средах и при глубинном культивировании выявлена невысокая фосфатсолубилизирующая активность штамма 92 в сравнении с другими протестированными нами штаммами *P. polymyxa*.

В модельных экспериментах инокуляция бактериями *P. polymyxa* 92 или обработка препаратами их ЭПС оказывала стимулирующее влияние на ранние стадии развития пшеницы (*Triticum aestivum* L.) Саратовская 29: зафиксировано увеличение длины и массы сухого вещества корней и побегов 7-суточных проростков. Выявлена способность данных бактерий к активной колонизации корней проростков пшеницы, что имеет существенное значение для формирования эффективной растительно-бактериальной ассоциации. Ранее нами было показано вовлечение ЭПС бактерий *P. polymyxa*, в том числе штамма 92, в процессы образования биопленок на абиотических поверхностях [3] и индукции морфологических изменений корневых волосков [4].

Учитывая настоящие и полученные ранее результаты, можно сделать заключение о том, что штамм 92 является перспективным для разработки и создания на его основе эффективных биопрепаратов для сельского хозяйства.

1. Zhang *et al.* (2018) *Biological Control*. 127: 70–77.
2. Rybakova *et al.* (2016) *Plant Soil*. 405: 125–140.
3. Yegorenkova *et al.* (2011) *Curr Microbiol*. 62: 1554–1559.
4. Yegorenkova *et al.* (2013) *Curr Microbiol*. 66:481–486.

ВЛИЯНИЕ ПЛЕНОЧНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА ЛЕЙКОГРАММУ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОЖОГА

Урядова Г.Т., Савина С.В., Фокина Н.А., Карпунина Л.В.

Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, Россия, Саратов
eni_galina@mail.ru

Целью работы явилось изучение влияния пленочных покрытий, созданных на основе экзополисахаридов (ЭПС) молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus*, на различные формы лейкоцитов – эозинофилы, нейтрофилы, лимфоциты, моноциты (лейкограмму) в процессе заживления ожогов степени IIIa у самок крыс. Для проведения эксперимента крысы были поделены на 5 групп: 1 группа – животные без ожога, 2 группа – животные, у которых вызывали ожог, 3 группа – животные, у которых вызывали ожог с последующим нанесением коммерческого препарата 5% декспантенол, 4 и 5 группы – животные, которым после ожога наносили пленочные покрытия на основе растворов ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* соответственно. Моделировали ожог степени IIIa под эфирным наркозом на межлопаточном пространстве крысы дном пробирки с кипящей водой в течение 30 секунд. Нанесение бактериальных ЭПС проводили сразу же после нанесения ожога и далее ежедневно в течение 28 суток эксперимента. Для установления влияния исследуемых пленочных покрытий на лейкограмму у крыс всех групп кровь была взята через 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 суток эксперимента. Результаты лейкограммы показали, что пленочные покрытия на основе ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* оказывают влияние на кроветворение и стимулируют ускорение завершения инфекционного процесса. В группах крыс с применением пленочных покрытий, созданных на основе ЭПС, процентное содержание лейкоцитов восстановилось до физиологической нормы раньше, чем в группе крыс без лечения. Изменений в морфологии лейкоцитов крови животных ни в одной из групп на протяжении эксперимента установлено не было.

ГЛИКОПОЛИМЕРЫ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Федоненко Ю.П.^{1,2}, Сигида Е.Н.¹, Коннова С.А.^{1,2}

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет

имени Н.Г. Чернышевского, Россия, Саратов

fedonenko_yu@ibppm.ru

Бактерии, стимулирующие рост и развитие растений (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), представляют собой допустимый инструмент в увеличении производительности сельскохозяйственных культур и перспективную альтернативу устаревшим агротехнологиям. Их стимулирующий эффект опосредован высокой конкурентоспособностью в отношении фитопатогенной микрофлоры, способностью увеличивать доступность и усвоение растениями питательных веществ, а также активной продукцией фитогормонов. Использование биопрепаратов на основе PGPR позволяет увеличивать плодородие почвы и урожайность агрономических культур без нанесения вреда окружающей среде [1].

Среди альфа-, бета- и гамма-протеобактерий, а также фирмикутов к группе PGPR отнесены представители родов *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Niveispirillum*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* и *Zoogloea* и др, которые являются объектом интенсивных научных исследований на протяжении последних десятилетий [2].

Бактериальные полисахариды принимают непосредственное участие на каждом из начальных этапов формирования растительно-микробной ассоциации, а также задействованы в реализации других межорганизменных взаимодействий с представителями почвенной микрофлоры. Понимание конкретных функций, выполняемых гликополимерами PGPR в этих сложных коммуникативных процессах, в полной мере возможно только при условии установления первичной структуры этих биомакромолекул.

Спектр продуцируемых бактериями гликополимеров достаточно широк и включает в себя экстраклеточные формы полисахаридов, гликополимеры клеточных стенок (пептидогликан и липотейхоевые кислоты грамположительных, а также липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий), полисахаридные фибриллы и гликозилирующие фрагменты белков поверхности микроорганизмов [3-6]. Среди этого многообразия углеводсодержащих биополимеров в изучении структурных особенностей ЛПС грамотрицательных бактерий, относящихся к PGPR, достигнут определенный прогресс. ЛПС, как известно, наряду с белками формируют внешний слой наружной мембраны грамотрицательных бактерий и занимают большую часть поверхности клетки. В докладе будут представлены сведения о современном состоянии исследований гликополимеров ризобактерий, их структурно-функциональных особенностях, роли в установлении ассоциативного симбиоза с растениями на основании литературных и собственных экспериментальных данных

1. Gouda *et al.* (2018) *Microbiol. Res.* 206:131–140.
2. Santi *et al.* (2013) *Ann. Botany.* 111: 743–767.
3. Rajagopal *et al.* (2017) *J. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 404: 1–44.
4. Auer *et al.* (2017) *Biochemistry.* 56(29): 3710–3724.
5. Schade *et al.* (2016) *FEBS Lett.* 590(21): 3758–3771.
6. Merino *et al.* (2014) *Int. J. Mol. Sci.* 15(2): 2840–2857.

ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ И БИОКОМПОЗИТЫ НА ИХ ОСНОВЕ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Цивилева О.М.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
tsivileva@ibppm.ru

Культивируемые высшие грибы – настоящая биофабрика биологически активных соединений, привлекательные объекты биотехнологии как наиболее эффективные из известных участников процессов биодеструкции растительных отходов, а также как продуценты антимикробных композиций.

Значительные усилия по совершенствованию производства функциональных ингредиентов и натуральных питательных добавок направлены на получение микроорганизмов, биомасса которых обогащена биометаллами. Такие усилия могут быть весьма результативны с привлечением грибных культур путем их обогащения субстанциями, содержащими эссенциальные элементы. Поэтому важным направлением развития научных основ искусственного культивирования грибов является методология оптимизации минерального питания и доставки металлов(II), таких как Cu, Mn, Fe, Zn, Co. Органическая форма микроэлементов обладает значительными преимуществами перед их неорганическими прекурсорами в разных аспектах безопасности, кроме того, при условии использования в виде неорганических солей металлы малодоступны для жизнедеятельности организмов.

Углубленное изучение разнообразия метаболитов макромицетов актуально также в связи с разработкой новых биопрепаратов, обладающих сочетаниями биотехнологически полезных признаков с направленностью на развитие фундаментальных основ "зеленой" химической биотехнологии получения органо-неорганических материалов. Нами предложены методы получения субмикро- и нанобиокомпозитов, в которых микроэлемент – металл или селен – конъюгирован с биополимерами грибного происхождения, обладающими ценными в биотехнологическом и биомедицинском плане свойствами. Внеклеточные метаболиты грибных культур служат восстанавливающими и стабилизирующими агентами для получения элемент-содержащих частиц в момент их образования *in vivo* из нетоксичных органических форм, аминокислотных хелатов (аспартатов биогенных металлов(II)) или кумариновых комплексов.

Интерес к производным кумарина обусловлен как их широким практическим применением, так и уникальной реакционной способностью хромен-2-оной системы в структуре молекул, которая может проявлять свойства ароматического кольца, алкена или ненасыщенного лактона. Многие природные и синтетические производные кумарина обладают ярко выраженной физиологической активностью. Одним из направлений наших исследований стали выявление антимикробных и ростостимулирующих свойств метаболитов грибных культур, полученных в условиях выращивания в присутствии соединений кумариновой природы и их комплексов с биогенными металлами(II), характеристика эффекта низкомолекулярных добавок и оценка перспектив биотехнологического использования. Получены комплексы металлов(II) с производными кумарина, вновь синтезированными коллегами из СарГУ под рук. проф. О.В. Федотовой. Выявлена антибактериальная активность продуктов биотрансформации полученных комплексов базидиомицетами против ряда фитопатогенных бактерий, возможность создания на этой основе новых биопрепаратов – факторов регуляции устойчивости растений к фитопатогенам. При исследовании влияния систем, содержащих 4-гидроксикумариновый фрагмент, на плодоношение высших грибов оказалось, что роль индуктора способно играть вещество кумариновой природы.

В работе получены селен- или биометалл-содержащие биокомпозиты из ряда лекарственных базидиомицетов, новые данные об антибактериальных свойствах полимерных субстанций биологического происхождения. Микосинтез антимикробных агентов имеет перспективу содействия решению проблемы поиска антибиотиков и биопестицидов нового поколения.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА *Metarhizium brunneum* В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕНОВ И РАСТЕНИЙ

Шаталова Е.И.^{1,2}, Шнатов Т.В.², Рачилов Д.А.², Дубовский И.М.^{1,2}

¹ Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, Россия, Новосибирск

² Новосибирский государственный аграрный университет, Россия, Новосибирск
elenashatalova@mail.ru

В настоящее время в защите растений существует проблема создания биопрепаратов с полифункциональным действием. Такой препарат должен обладать не только ярко выраженными инсектицидными свойствами, но и оказывать ростостимулирующие действия на растения, а также обладать антагонистическими свойствами по отношению к фитопатогенам [1, 2]. Одним из источников получения таких препаратов могут быть энтомопатогенные грибы, в частности рода *Metarhizium* [3, 4].

В связи с этим были проведены испытания двух штаммов микромицета *Metarhizium brunneum* М 2017 и F596 на наличие ростостимулирующего действия на проростки рапса (*Brassica napus*) и антагонистических свойств по отношению к фитопатогенным грибам *Fusarium oxysporum* и *Rizoctonia solani*.

Оценку антагонистического влияния штаммов *M. brunneum* осуществляли с использованием метода встречных культур. Были отмечены проявления антибиотического антагонизма микромицета *M. brunneum*, ограничивающий рост *F. oxysporum*. При взаимодействии *R. solani* и *M. brunneum* М 2017 наблюдалось срастание колоний с образованием барража.

По результатам эксперимента, проведенном на проростках рапса, и направленных на выявление ростостимулирующего действия *Metarhizium brunneum*, было выявлено отсутствие прямого влияния на витальные (энергия прорастания, всхожесть), морфологические (длина вегетативной и корневой частей проростков) и физиологические (сухая и влажная масса вегетативной и корневой частей проростков) показатели.

Полученные результаты будут использоваться в дальнейших исследованиях по изучению взаимодействия в системе триотрофа в различных агроценозах.

1. Леляк и др. (2014) Защита и карантин растений. 4: 21–23.
2. Штерншис и др. Материалы конференции «Полифункциональное действие энтомопатогенных...». Иркутск, 2015. С. 347–352.
3. Kang et al. (2018) *Mycobiology*. 46(4): 440–447.
4. Ownley et al. (2010) *BioControl*. 55: 113–128.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ 18-316-20007

БАКТЕРИИ РОДА *Azospirillum* В ОПТИМИЗАЦИИ ИСКУССТВЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШИХ ГРИБОВ - КСИЛОТРОФОВ

Шатерников А.Н., Цивилева О.М., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
andrejsh93@gmail.com

Мир высших грибов очень разнообразен с точки зрения практического использования, но многовековой опыт по культивированию грибных культур четко ориентирует на промышленное производство ряда наиболее ценных в этом плане базидиомицетов. Представители этого класса высших грибов интересуют битехнологов не только в качестве источника ценных пищевых ингредиентов, но и как основа для получения высокоэффективных лекарственных препаратов.

Внедрение биологических способов стимуляции роста мицелия и защиты его от посторонней микрофлоры позволило бы улучшить технологию выращивания грибов, сократив время культивирования и одновременно подавив рост контаминирующей микрофлоры. Повысить устойчивость гриба к негативным воздействиям окружающей среды возможно за счет выращивания его совместно со стимулирующими рост микроорганизмами.

Ризосферные бактерии рода *Azospirillum* являются ассоциативными азотфиксаторами, стимулирующими рост и развитие растений посредством фиксации атмосферного азота и гормональной регуляции [1]. Отмечается бактерицидная и фунгицидная активность азоспирилл [2, 3]. Важно выявление и исследование ростостимулирующих свойств разных штаммов азоспирилл в отношении съедобных и лекарственных высших грибов, а также свойств, стимулирующих подавление контаминантной микрофлоры в двойной культуре.

Системное изучение совместного культивирования базидиомицетов с бактериями рода *Azospirillum* в искусственных условиях в литературе ранее не описывалось, за исключением экспериментов по изучению двойных культур *Lentinula edodes* и *Azospirillum brasilense* Sp7, проводимых в лаборатории микробиологии ИБФРМ РАН [4]. Необходимо провести поиск наиболее эффективного штамма азоспирилл в отношении грибов разных систематических групп, а также найти причины активизации и стимуляции развития мицелия при совместном культивировании. Задачи такого рода поставлены в наших продолжающихся исследованиях.

Объектами исследования служили ксилотрофные базидиомицеты *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* и *Flammulina velutipes*, известные своими ценными и лечебными свойствами. В качестве бактериальных ко-инокулятов использовали штаммы *A. brasilense* Sp245 и *A. brasilense* SR80.

В целях оптимизации получения мицелия при глубинном культивировании проводился подбор наиболее подходящих условий и составов сред для выращивания совместных бактериально-грибных культур.

1. Bashan *et al.* (2010) *Advances in agronomy*. 108: 77–136.
2. Bashan *et al.* (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 2637–2643.
3. Tortora *et al.* (2011) *Archives of microbiology*. 193(4): 275–286.
4. Лощина и др. (2006) *Вестник СГАУ*. 6(2): 24–26.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ДЕКОЛОРИЗАЦИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ АЗОСПИРИЛЛАМИ

Шатерников А.Н., Купряшина М.А., Пономарева Е.Г., Никитина В.Е.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
andrejsh93@gmail.com

Предполагается, что в энзимологии бактериальной деградации синтетических красителей ведущую роль играют фенолоксидазы. Ранее нами показана способность к продукции фенолоксилирующих ферментов бактериями рода *Azospirillum*. Известно, что состав среды культивирования оказывает большое влияние на метаболизм микроорганизмов и, соответственно, на ферментативную активность. Для фенолоксидаз как бактерий, так и грибов характерно увеличение активности ферментов при культивировании на бедной по азоту и углероду среде, при этом присутствие в среде культивирования сложных органических соединений, например дрожжевого экстракта, несмотря на увеличение биомассы, существенно снижает активность.

Мы исследовали влияние источников азота и углерода в среде культивирования на эффективность обесцвечивания азоспириллами синтетических красителей. В условиях эксперимента выращивание бактерий проводилось при внесении 0,01 мМ малахитового зеленого и 0,05 мМ ремазола ярко-голубого. В качестве источников углерода в среду культивирования вносили малат натрия, глюкозу или фруктозу в концентрациях 5, 10, 25 г/л, в качестве источников азота хлорид аммония, нитрат калия и дрожжевой экстракт, в концентрациях 1, 2, 5 г/л.

Эффективность обесцвечивания малахитового зеленого снижалась при использовании в качестве источника углерода глюкозы примерно на 20%, и фруктозы на 10%, независимо от концентрации сахаров. На среде с малатом натрия степень обесцвечивания красителя была максимальной, но в тоже время увеличении концентрации до 15 г/л приводило к снижению эффективности биodeградации малахитового зеленого в два раза. Аналогичная тенденция прослеживается и при обесцвечивании ремазола-ярко голубого, а именно снижение эффективности деколоризации при выращивании на глюкозе, и при внесении высоких концентрации малата натрия. Для штамма *A. brasilense* Sp245 отмечалось снижение деструкции красителей при внесении в среду культивирования дрожжевого экстракта, что справедливо как для малахитового зеленого, так и для ремазола ярко-голубого. Ранее нами было показано, что выращивании *A. brasilense* Sp245 на среде с дрожжевым экстрактом приводит к снижению активности ферментов фенолоксидазного комплекса. Также уменьшение степени обесцвечивания красителей вызывало присутствие нитрата калия, что интересно, так как нитрат калия является специфическим ингибитором активности фенолоксидаз.

Таким образом, удалось выявить общую тенденцию к снижению эффективности деколоризации синтетических красителей азоспириллами, при культивировании на богатой по составу среде. Отметим, что изменение состава среды выращивания оказывает влияние на процесс обесцвечивания, но не ингибирует его полностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-316-00008 мол_a

ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Швец К.Ю., Баймиев Ал.Х., Мавзютов А.Р., Тамарова Э.Р., Латыпова Р.Ф.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Россия, Уфа

kseniya.shvets@yandex.ru

На сегодняшний день известно, что инфекционные заболевания, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, являются наиболее опасными болезнями человеческого организма [1]. Всё большее беспокойство вызывает появление и молниеносное распространение микроорганизмов, резистентных по отношению к большинству известных классов антибиотиков [2]. Именно поэтому поиск новых потенциальных антибиотиков остается достаточно важной практической задачей.

Цель исследования – оценка антимикробной активности новых химических соединений, отобранных с помощью репортерной конструкции pDualrep2, в отношении клинически значимых штаммов микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

В исследование были включены 166 соединений различной химической природы и объединенных в 4 группы по механизму действия (действующие по механизму ингибирования биосинтеза белка, по механизму индукции SOS-ответа, сочетающие действие указанных механизмов и с неизвестным механизмом действия). Были использованы следующие тестовые штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* (№25922 ATCC), *Klebsiella pneumoniae* (№181210171-2), *Pseudomonas aeruginosa* (№27853 ATCC), *Staphylococcus aureus* (№206 ATCC USA) и *Candida albicans* (№181210169-1). Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия).

Исследование антимикробной активности новых химических соединений с помощью диско-диффузионного метода позволило получить данные о чувствительности тестовых культур микроорганизмов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* к исследуемым соединениям. Эксперименты показали, что растворы тестируемых соединений обладают различной степенью антимикробной активности в отношении штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Достаточно высокой активностью в отношении 3 и более штаммов обладали 68 химических соединений (на 21%, $\chi^2 = 16,36$, $p < 0,05$). Стоит отметить, что в данной группе преобладали соединения с неизвестным механизмом действия, составившие 32% от общего количества соединений. Остальные молекулы-антибиотики обладали менее выраженной активностью и действовали только в отношении единичных штаммов микроорганизмов.

1. Kumar *et al.* (2019) *Chest*. 136(5): 1237–1248.
2. Martin *et al.* (2017) *GMS Hyg Infect Control*. 12: 37–45.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№17-74-30012)

ПРОТИВОСТАФИЛОКОККОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНДОФИТНОГО ГРИБА *Thielavia microspora* - MO46L

Юсупов У.К., Сохибназарова Х.А., Абдульмянова Л.И.
Институт микробиологии АН Республики Узбекистан, Ташкент
imb-anruz@mail.ru

В настоящее время эндофитные грибы, обитающие во всех ныне существующих на Земле растениях, бесспорно являются неисчерпаемым источником разнообразных биологически активных соединений, в том числе и антибиотиков. Так, в ряде исследований сообщается о большом числе антимикробных веществ, выделенных из эндофитов рода *Xylaria*, населяющих различные растения-хозяева и принадлежащих к нескольким структурным классам. Например, сордарицин и мультиплоидес, активны против *Candida albicans*, меллизол и 1,8-дигидронафтол глюкопиранозид против герпеса. Биоактивное вещество из культуральной жидкости эндофита *Xylariasp.* YX-28, выделенного из *Ginkgo biloba* L., идентифицированное как 7-аминометилкумарин обладало широким спектром антимикробной активности против ряда пищевых инфекций, в том числе, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *A. hydrophila*, *Yersinia sp.*, *V. anguillarum*, *Shigellasp.*, *V. parahaemolyticus*, *C. albicans*, *P. expansum*, *A. niger*, и рекомендовано как натуральный пищевой консервант. Другой штамм *Xylariasp.* из *Abies holophylla* оказался продуцентом гризеофульвина – антибиотика против грибных инфекций человека и животных. Нами ранее из листа *Melissa officinalis* (Мелиссы лекарственной) был впервые выделен в условиях Узбекистана и идентифицирован эндофитный гриб *Thielavia microspora* - MO46L, экстракт которого показал высокую антибактериальную активность против коллекционных культур *S.aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*. При этом наибольшая зона подавления роста на уровне 32-35мм выявлена по отношению к *S.aureus*.

Учитывая, что в последнее время все большее число клинических изолятов *S. aureus* проявляют устойчивость к традиционным антибиотикам, изучение антибактериальных свойств эндофитных грибов является весьма актуальным.

В этой связи, нами исследована противостафилококковая активность экстракта эндофита *T. microspora* - MO46L против 10 клинических изолятов золотистого стафилококка, выделенных у больных с дерматологическими заболеваниями, таких как атопический дерматит, фолликулит, угревая болезнь и предварительно идентифицированные с помощью дифференциально-диагностической питательной среды *Staphylococcus agar*. Изучение активности экстракта эндофита проводили методом пятен на агаре. В результате исследований установлено, что к 4 клиническим изолятам: *Staphylococcus gemaliticus*, *Staphylococcus epidermis D-1*, *Staphylococcus epidermis D-3* и *Staphylococcus epidermis D-6* экстракт эндофита *T. microspora* - MO46L проявляет наибольшую активность, выражающуюся в зоне подавления роста культур более чем на 30мм.

Таким образом, выявленная высокая противостафилококковая активность экстракта эндофитного гриба *T. microspora* - MO46L предполагает высокую перспективность его использования для получения противостафилококковых соединений, имеющих значение в клинической практике.

Современные методы исследования микроорганизмов, растений и их сообществ

АНАЛИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ *A. brasilense* Sp245 С ПРИМЕНЕНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Буданова А.А., Маторы Л.Ю., Щеголев С.Ю.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
anglinca@mail.ru

Важнейшими компонентами клеточной поверхности азоспирилл являются жгутики и пили, определяющие их подвижность, иммунохимические свойства и опосредующие взаимодействия бактерий с растениями и разнообразными объектами окружающей среды.

Методом молекулярного моделирования по шаблону [1] нами впервые исследованы 2D и 3D структуры белков, аннотированных в геноме штамма *A. brasilense* Sp245 [2] как составляющие флагеллы и пилеобразующие белки, проанализированы их таксономические характеристики. В том числе FlgE (материал крюка), FlgK и FlgL (связь филамент-крюк), FliC (материал филамента), FliD (материал наконечника) и FlgA (участник сборки Р-кольца базального тела жгутика), а также аналоги белков секреторной системы TAD [3], найденные в протеоме *A. brasilense* Sp245: препилин Flp IVb (низкомолекулярный белок фимбрий); CpaB, CpaC и CpaD (компоненты комплекса секрета внешней мембраны); CpaF (АТФ-аза для сборки филамента из Flp); структурная субъединица TadG (она же якорь для пилей во внутренней мембране клеток); пептидаза препилина, осуществляющая процессинг предшественников структурных составляющих пилей. Для обнаружения гомологов исследуемых белков применяли технологию SmartBlast, оптимизирующую решение этой задачи в протяженных эволюционных масштабах среди бактерий, архей и эукариотов. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей по стандартным методикам дополняли результатами на основе полногеномного секвенирования ДНК штаммов с помощью тестов средней нуклеотидной ANI и средней аминокислотной AAI идентичности [4].

Отмечено соответствие в целом 3D структуры FliC из *A. brasilense* Sp245 структуре его отдаленно родственных гомологов из сальмонеллы, псевдомонады, буркхольдерии и сфингомонады с наличием общей, эволюционно сложившейся коровой области у этих белков в их высоко консервативных доменах D0-D2 (альфа-спирали). Для представителей более близкородственных родов *Azospirillum*, *Niveispirillum* и *Nitrospirillum* эта коровая область распространяется также и на вариабельный домен D3 (петли и бета-слои). При использовании последовательностей FliC в качестве филогенетических маркеров для представителей семейства *Azospirillaceae* (в номенклатуре GTDB [5]) выявлен высокий уровень соответствия топологии полученных филогенетических конструкций топологии деревьев, полученных в полногеномных тестах ANI и AAI. Это актуализирует уточнение представлений относительно уровня консервативности FliC, а также возможную целесообразность использования его последовательностей в таксономических исследованиях прокариот.

Несмотря на отсутствие гомологии аминокислотных последовательностей фолдинг препилина Flp IVb имеет высокую степень структурного сходства в 3D с искусственно созданным белком DHR81, собранным из tandemного повтора структурного мотива типа спираль-петля-спираль-петля (PDB 5CWQ). Для белка CpaB обнаружено соответствие его фолдинга 3D-структуре шаперона FlgA (белок флагеллы) из *Salmonella typhimurium* LT2 (PDB 3TEE), а для TadG – белка FlgK из *Burkholderia pseudomallei* K96243 (PDB 4UT1), соединяющего крюк и филамент бактериального жгутика. Исходя из этого получены дополнительные свидетельства структурной аналогии и возможной эволюционной взаимосвязи пилеобразующих белков азоспирилл с белками аппарата синтеза и сборки их полярного жгутика.

1. Yang *et al.* (2015) *Nat. Meth.* 12: 7–8.
2. Wisniewski-Dye *et al.* (2011) *PLoS Genetics*. 7: e1002430.
3. Tomich M. *et al.* (2007) *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 363–375.
4. Rodriguez-R *et al.* (2018) *Nucl. Acids Res.* 46: W282–W288.
5. Parks *et al.* (2018) *Nat. Biotechnol.* 36: 996–1004.

СПОСОБЫ ИНОКУЛЯЦИИ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ГРИБОМ *Beauveria bassiana*

Грушевая И.В., Погребняк С.М., Герус А.В., Левченко М.В.
Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Россия, Санкт-Петербург
grushevaya_12@mail.ru

Искусственное заселение кукурузы кукурузным мотыльком и заражение грибом *Beauveria bassiana* (инъекция конидий шприцом в междоузлие или опрыскивание листьев из расчета 10^7 конидий/растение) проводили на различных гибридах кукурузы в фазу 6-7 сформированных листьев. Полученные результаты свидетельствуют, что на ранних этапах развития на растениях всех генотипов наблюдалось снижение повреждаемости растений по сравнению с вариантом заселения мотыльком без внесения гриба. Однако, на поздних этапах проведения опыта лишь на одном гибриде при обоих вариантах обработки растений энтомопатогенным грибом отмечался эффект снижения численности насекомого. Таким образом, вполне вероятно, что смертность фитофага от гриба в определенной степени зависит от кормового растения, как центрального элемента системы триотрофа.

В следующем эксперименте проверяли способность к колонизации гриба *B. bassiana* (шт. ББК-1) растений кукурузы (*Zea mays* L.) при разных вариантах обработки растений: замачивание семян, полив почвы после появления всходов и опрыскивание вегетирующих растений через неделю после всходов. При всех произведенных обработках было установлено, что гриб *B. bassiana* успешно колонизировал растения, при этом в контроле (не обработанные растения) наличие этого микромицета обнаружено не было.

Анализ полученных данных показал, что наибольшее количество колонизированных микромицетами растений наблюдалось в варианте с поливом почвы. В данном случае доля растений, из которых выделялся гриб, составила 3/4 от общего числа растений. На втором месте по уровню колонизации находится вариант с замачиванием семян в споровой суспензии перед посевом – 71%. Наименьший уровень колонизации наблюдался при опрыскивании вегетирующих растений – 57%. Контрольные растения кукурузы не показали наличия гриба *B. bassiana*.

Оценка уровня колонизации растений, при разных способах обработки, по количеству обросших *B. bassiana* фрагментов листа показала, что наибольшее количество фрагментов, давших рост колоний, наблюдалось при инокуляции семян кукурузы и поливе почвы. Этот показатель составил 20 % для обоих способов обработки. Уровень колонизации при опрыскивании вегетирующих растений оказался немного ниже и составил 17,14%

Таким образом, обработка семян и полив почвы показали сопоставимые результаты, как по доли колонизированных растений, так и по уровню колонизации грибом *B. bassiana*. Опыскивание вегетирующих растений кукурузы показало наиболее низкий уровень колонизации.

Исследование поддержано грантом РФФИ 18-316-00082-мол_a

АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАМЕТ КУКУРУЗЫ

Гусев Ю.С., Моисеева Е.М., Гуторова О.В., Волохина И.В., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
gusev_yu@ibppm.ru

Работа посвящена изучению механизма двойного оплодотворения у растений, в частности, генов, контролирующих слияние спермия и яйцеклетки у кукурузы. В 2017 г. установлено, что белок HAP2/GCS1 обеспечивает слияние мембран спермия с яйцеклеткой как у растений, так и у животных [1]. У арабидопсиса помимо белка HAP2/GCS1 на этапе взаимодействия (адгезии) мембран спермия и яйцеклетки необходим еще белок GEX2 [2]. Ранее нами обнаружена гомология (67% идентичности) для гена *hap2* арабидопсиса и последовательности кукурузы ZM_BFb0162K03, содержащей консервативный регион полностью идентичный соответствующим регионам генов арабидопсиса. Проведенный нами поиск гомологов гена *gex2* арабидопсиса в геноме кукурузы положительных результатов не дал, однако, в результате поиска транслированных белковых последовательностей с помощью у кукурузы был найден предсказанный белок ZM_GEX2 [3].

Целью данной работы было проведение анализа экспрессии и секвенирование генов (*ZM_hap2*, *ZM_gex2*) взаимодействия гамет кукурузы и анализ 3D-структур белков, кодируемых этими генами.

Установлено, что экспрессия гена *Zm_hap2* кукурузы не является спермий-специфичной, в то время как для гена *ZM_gex2* характерна спермий-специфичная экспрессия.

При секвенировании последовательности гена *Zm_hap2* линий ЗМС-П и ГПЛ-1 кукурузы нами впервые показано, что они полностью идентичны между собой и с фрагментом (1467 н.о.) последовательности ZM_BFb0162K03 кукурузы линии (GenBank). Секвенирование ПЦР-продуктов (фрагмент 2822-bp гена *ZM_gex2*) из кДНК пыльцы ЗМСП нами впервые показано, что последовательность гена *ZM_gex2* линии ЗМС-П имеет 28 несовпадений с реферной последовательностью линии В73.

Построены 3D-структуры белков, кодируемых генами взаимодействия гамет кукурузы. Впервые охарактеризованы вторичные структуры этих белков.

1. Valansi *et al.* (2017) *J. Cell Biol.* 216: 571–581.
2. Mori *et al.* (2014) *Curr. Biol.* 24: 170–175.
3. Волохина *и др.* (2017) *Онтогенез.* 2: 134–139.

Работа выполнена с частичной поддержкой Программы ФНИ госакадемий наук на 2013-2020 гг. (№ гос. регистрации АААА-А17-117102740101-5) и гранта РФФИ №18-016-00155

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Bacillus*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕРЗЛОТЫ

*Доманская О.В.*¹, *Боме Н.А.*², *Колоколова Н.Н.*²

¹ Международный центр криологии и криософии, Тюменский государственный университет,
Россия, Тюмень

² Институт биологии, Тюменский государственный университет, Россия, Тюмень
olga-nv@bk.ru

В настоящее время против болезней и вредителей сельскохозяйственных культур в большинстве случаев применяются химические средства защиты растений. Применение фунгицидов в условиях севера является малоэффективным средством, и это связано с тем, что химические реакции идут гораздо медленнее и требуются более высокие дозы, чем на юге. Деградация химических веществ в почве, в условиях холодного климата происходит очень медленно. Альтернативой фунгицидам могут служить природные штаммы бактерий и грибов-антагонистов фитопатогенов, выделенных из низкотемпературных мест обитания [1]. В данной работе представлены результаты по поиску перспективных штаммов среди бактерий рода *Bacillus*, выделенных из мерзлых отложений, как потенциальных биоагентов, способных к антагонизму в отношении фитопатогенных грибов, продуцированию биологических веществ, способствующих активации ростовых процессов *Avena sativa* L. Определена антифунгальная активность штаммов бактерий методом лунок при диффузии в агар [2]. В качестве тест-объекта использовали чистые культуры фитопатогенных грибов *Alternaria* sp., *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Fusarium graminearum* (Schwabe), *Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallet. Показано, что антифунгальная активность была отмечена только у *B. megaterium* 312 (при температуре выращивания +5°C) и *B. cereus* 875 (при температуре выращивания 22°C и 45°C). Практически все исследуемые штаммы обладали хитиназной активностью [3], которая изменялась в зависимости от температуры культивирования. Способность бактерий синтезировать ауксин была изучена по реакции с реактивом Сальковского колориметрическим методом при длине волны 535 нм [4]. У всех исследуемых штаммов была отмечена ауксинпродуцирующая способность. Производство ауксина зависело от температуры культивирования. Наиболее активным продуцентом индолил-3-уксусной кислоты при трех температурах культивирования оказался штамм *B. simplex* 948P1 (13,5-95,2 мкг/мл). Произведен отбор перспективных штаммов на основе результатов лабораторного эксперимента по изучению влияния бактериализации семян *Avena sativa* L. на изменчивость морфометрических параметров проростков. Семена овса инокулировали бактериальной суспензией, полученной при температуре культивирования 5°C и 22°C с титром 10⁸-10⁹ кл/мл, и проращивали в рулонах из фильтровальной бумаги при температуре 20±2°C. Расчет индексов длины и соотношения массы корней и побегов позволяет уже в начале онтогенеза судить о характере ответной реакции растительного организма на действие штаммов бактерий рода *Bacillus*.

1. Волкова и др. (2014) *Фундаментальные исследования*. 2: 153–157.
2. Егоров. Основы учения об антибиотиках. М.: МГУ, Наука, 2004. 528 с.
3. Авраменко. (2006) *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчиникова*, 1(2): 11–18.
4. Gordon. (1951) *Plant Physiol.* 26: 192–195.

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ БАКТЕРИОФАГА НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК *Azospirillum lipoferum* SR65

Караваева О.А., Гулий О.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
helga1121@yandex.ru

Бактериофаги почвенных микроорганизмов привлекают внимание исследователей из-за их повсеместного распространения, многообразия и важной экологической роли. Однако, большинство исследований основано на выделении бактериофагов из различных объектов окружающей среды, в том числе почвы, и лишь незначительная часть работ посвящена получению и характеристике бактериофагов, выделенных из бактериальных клеток. Несмотря на то, что почвенные микроорганизмы широко изучаются, данных о бактериофагах почвенных микроорганизмов и оценки адсорбции бактериофагов на поверхности гомологичных клеток сравнительно мало. Поэтому перспективным направлением является выделение и изучение бактериофагов из почвенных микроорганизмов, в том числе из клеток *Azospirillum lipoferum*. В работе из микробных клеток *A. lipoferum* штамма SR65 выделен бактериофаг и обозначен как ФАI-SR65. Титр бактериофага ФАI-SR65, определенный с помощью метода агаровых слоев, составил $1,6 \times 10^9$ частиц в 1 мл. Бактериофаг ФАI-SR65 на газоне индикаторного штамма образует полупрозрачные, овальные негативные колонии, с ровным четким краем, диаметром примерно 0,1 см. Генетический материал бактериофага представлен ДНК с размером около 50 тыс. пар нуклеотидов.

Показано, что бактериофаг ФАI-SR65 проявляет активность в отношении бактерий *A. brasilense* штаммов Sp7, Cd, SR75, Br14, S17, *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65 и RG20a, *Niveispirillum irakense* KBC1, *A. halopraeferans* Au4, но не вызывает лизис клеток *A. brasilense* штаммов Sp245, KR77, Jm 6B2, S27, SR55, *N. irakenze* KA 3, *Nitrospirillum amazonense* Am14. Проведенные исследования продемонстрировали отсутствие его литической активности по отношению к бактериям гетерологичных родов: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

Метод электронной микроскопии является одним из распространенных методов прямой регистрации взаимодействия вирусов с поверхностными структурами клеток. Проведенные электронно-микроскопические исследования препаратов бактериофага ФАI-SR65 показали, что бактериофаг имеет сферическую головку размером около 32 нм и короткий хвостовой отросток размером до 9 нм. Учитывая морфологические особенности, выделенный бактериофаг по Международной классификации и номенклатуре вирусов относится к семейству *Podoviridae*. По классификации предложенной А.С. Тихоненко – ко II морфологической группе: «Фаги с аналогом отростка». Проведено электронно-микроскопическое изучение адсорбции бактериофагов ФАI-SR65 на поверхности клеток-хозяина. Методом электронной микроскопии на уровне отдельных клеток зарегистрированы (визуализированы) начальные стадии взаимодействия бактериофагов ФАI-SR65 с микробными клетками комплементарного штамма *A. lipoferum* SR65. Показано, что бактериофаг ФАI-SR65 не адсорбируется на культурах, к которым не проявляют активности. Выявлена корреляция результатов электронной микроскопии с данными, полученными стандартным микробиологическим высевом на плотные питательные среды.

Таким образом, из клеток *A. lipoferum* SR65 выделен бактериофаг ФАI-SR65 и описаны его основные свойства. Проведенные электронно-микроскопические исследования начальных стадий взаимодействия бактериофага ФАI-SR65 с клетками-хозяевами демонстрируют особенности строения бактериофагов и их адсорбции на поверхности микробной клетки.

Проведенные исследования представляют интерес для развития учения о бактериофагах почвенных микроорганизмов.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ИЗМЕНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОФЛОРЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ПОЧВ

*Лоскутов С.И.¹, Пухальский Я.В.^{1,2}, Воробьев Н.И.², Пирмагомедов Р.Я.³, Лактионов Ю.В.²,
Кожемяков А.П.²*

¹ ООО НПО «БиоЭкоТех», Санкт-Петербург, Россия,

² ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург - г. Пушкин, Россия

³ РУДН, Москва, Россия

info@biocotech.ru

Почва является самым обширным депозитарием микробных сообществ как прокариотного, так и грибного комплекса на Земле. Разные типы и фациальные подтипы, известные на данный момент в иерархии почв, в той или иной степени влияют на различия в частотно-таксономической структуре микроорганизмов и показателях их альфа- и бета-биоразнообразия. Частотно-таксономический бонитет обуславливается совокупностью всех свойств конкретной почвы: физическими, водно-физическими, физико-химическими, генезисом, гранулометрическим и агрегатным составом. Кроме того, при изучении микробных сукцессий ризосферных систем участка почвы, немаловажным фактором может также являться обилие растительных формаций и состав их корневых выделений (экзометаболитов), главным образом низкомолекулярных органических кислот.

Микрофлора, как наиболее чувствительная к любым изменениям биогеоценоза система, может выступать индикатором состояния плодородия и «здоровья почв». Именно сбалансированное частотное и таксономическое разнообразие микроорганизмов определяет самоочищающую (санационную) и супрессивную активность почвенного фитопедоценоза.

Культивация микроорганизмов на селективных средах позволяет исследовать порядка 0,2-20% от общего числа микроорганизмов в почвенном покрове. Остальные 80-99% популяций не культивируются на известных селективных средах. Поэтому, благодаря появлению и активному развитию за последние годы в области молекулярной экологии новейших молекулярно-генетических методов, в частности технологии высокопроизводительного пиросеквенирования, микробиология получила возможность анализа структурных изменений в почвенных микробных сообществах в полном их геномном биоразнообразии - микробиоме, отражающем весь пул микроорганизмов. К настоящему моменту времени, большая доля расходов в научных исследованиях, связанна не с собственно процессом секвенирования, а с анализом полученных данных оператором.

Порядка 60% почвенного микробиома ассоциировано с органоминеральным гумусовым горизонтом почвы, сорбирующего в себе большую часть клеток микробов на поверхности твердой фазы агрегатов. Связь структурных перестроек микробных сообществ с внешними условиями и применением агротехнологий ещё мало исследована и может привести к переосмыслению всей современной научной парадигмы в почвенной микробиологии. Для наиболее полного раскрытия экологических и сервисных функций микробиома почв некоторые исследователи предлагают сочетать методы метагеномики (для оценки филогенетического разнообразия микроорганизмов), с анализом биомаркеров (для определения функционального разнообразия) и измерений ферментативной активности (для оценки актуальной функциональности почв). Поскольку почва является лабильной средой, способной непрерывно и кардинально меняться в течении краткосрочных (сезонных, годовых) и более длительных (десятки и сотни лет) периодов времени, перспективой данного направления, при условии масштабного и долгосрочного «хроно-скрининга», может быть создание крупнейшей в мире интерактивной (визуальной) *геоинформационной* базы данных, для разработки эффективных алгоритмов и многофакторных моделей прогнозирования и/или поддержания существующего уровня плодородия в адаптивно-ландшафтных системах земледелия для той или иной местности региона. Эта масштабная работа не может быть проведена без тесного сотрудничества специалистов из разных областей наук.

БИОФАБРИКИ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПРО- И ЭУКАРИОТ

Пылаев Т.Е., Авдеева Е.С.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
pylaev_t@ibppm.ru

Получение многих фармакологических препаратов, различных пищевых веществ, хозяйственно-важных биополимеров, стало возможным благодаря развитию методов генетической инженерии. С помощью трансформированных клеток животных сегодня получают человеческий γ -интерферон, поверхностный антиген гепатита В, иммуноглобулины и многие другие вещества. Из рекомбинантных штаммов бактерий и низших грибов получают гормональные препараты (инсулин, тиреоидные гормоны и др.), ферменты (супероксиддисмутаза, урокиназа, стрептокиназа и др.). Трансгенез стал мощным инструментом для исследования молекулярных основ экспрессии генов млекопитающих и их развития, для создания модельных систем, позволяющих изучать болезни человека, а также для генетической модификации клеток молочных желез животных с целью получения с молоком важных для медицины белков. Разработка новых эффективных методов переноса генов в эмбриональные и соматические клетки животных, а также совершенствование существующих подходов остается актуальной задачей. Известно множество способов внедрения экзогенной ДНК в геном животной клетки, или *трансфекции* клеток, основанные на использовании вирусных и безвирусных систем, химических агентов и физических воздействий (механическая микроинъекция, электропорация, сонопорация, лазерное облучение) и пр. Для успешного продвижения в клинической и лабораторной практике подобные системы должны удовлетворять целому ряду предъявляемым к ним требований. Во-первых, совместимость с различными типами клеток, тканей и организмов. Во-вторых, возможность доставлять объекты с варьируемыми геометрическими и физико-химическими параметрами. В-третьих, минимальное повреждающее действие (выживаемость клеток), максимальная эффективность (количество загруженных и экспрессируемых векторов), относительная дешевизна и простота исполнения. Однако ни один из известных на сегодняшний день методов в полной мере не удовлетворяет всему комплексу требований по объективным причинам. В связи с этим, мы считаем, что поиск новых перспективных систем внутриклеточной доставки генов, является крайне актуальной задачей современной биомедицины.

В докладе будут продемонстрированы результаты лабораторных испытаний нового варианта метода внутриклеточной доставки *in vitro* [1]. Принцип метода состоит в эффективном проникновении биомолекул за счет кратковременного увеличения проницаемости мембран клеток, выращенных на монослоях плазмонно-резонансных наночастиц при их лазерном облучении ИК-лазером. Особое внимание будет уделено оптимизации системы для оптопорации клеток животных и человека путем экспериментально обоснованного подбора режимов лазерного облучения и параметров монослоев наночастиц с учетом индивидуальных морфофизиологических особенностей клеток и доставляемых биомолекул. Будут представлены возможности разработанной нами системы оптопорации и перспективы её дальнейшего использования для трансформации прокариотических клеток, как основа новых разработок в области клеточной инженерии, регенеративной медицины, молекулярной фармакологии и пр.

1. Pylaev *et al.* (2019) J. Biophotonics. 12(1):e201800166.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект № 17-74-10090

НОКАУТ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО СЕКРЕТИРУЕМЫЙ БЕЛОК SVX *Pectobacterium atrosepticum*, МЕТОДОМ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Тендюк Н.В., Горшков В.Ю., Гоголева Н.Е., Исмаилов Т.Т., Гоголев Ю.В.
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань
natasha.tendjuk@rambler.ru

Фитопатогенные бактерии рода *Pectobacterium*, ущерб от которых с каждым годом возрастает, принято относить к опасным вредителям, вызывающим острые патологии у растений, которые значительно снижают продуктивность хозяина и зачастую приводят к гибели последнего. Воздействие на фитопатогены с помощью химических препаратов, а также внедрение в растения генов устойчивости, зачастую, приводит к достаточно быстрому появлению новых высокоагрессивных штаммов микроорганизмов. В связи с этим, существует необходимость создания принципиально новых подходов борьбы с бактериозами. Наиболее подходящим вариантом для снижения агрессивности фитопатогенов является контролируемое сдерживание размножения микроорганизмов в рамках латентных инфекций. Ключевыми факторами вирулентности фитопатогенных пектобактерий считаются ферменты, разрушающие растительную клеточную стенку. Однако существуют и другие детерминанты вирулентности, чьи механизмы и даже самые общие принципы действия остаются не известными. Среди них так называемый Svх белок, который стал объектом данного исследования.

Целью нашей работы было создание нокаут-мутанта *P. atrosepticum* по гену белка Svх методом сайт-направленного мутагенеза для дальнейшего исследования роли этого белка в патогенезе. В рамках цели были поставлены следующие задачи. Создать модель мутантного локуса *in silico* для направленного мутагенеза гена svх *P. atrosepticum*. Сконструировать мутантный локус *in vitro* для направленного мутагенеза гена svх *P. atrosepticum*. Получить мутанта *P. atrosepticum* по гену, кодирующему белок Svх. Сравнить ростовые характеристики дикого штамма *P. atrosepticum* и его мутантной формы по гену белка Svх.

В ходе проделанной работы в системе *in silico* была создана модель мутантного локуса для направленного мутагенеза гена svх *P. atrosepticum*, которую затем сконструировали в системе *in vitro*. В результате была получена мутантная форма *Pectobacterium atrosepticum* по гену, кодирующему белок Svх. Анализ ростовых характеристик при культивировании *in vitro* на неселективных средах не выявил различий между дикой и мутантной по гену svх формами *P. atrosepticum*, что позволяет сделать вывод о том, что мутация не повлияла на жизнеспособность бактерий, их способность размножаться или на их базовый метаболизм. Полученных мутантов по гену svх планируется использовать для последующего анализа их стратегии взаимодействия с растениями.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00194

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ ГРУППЫ OMP_{TIN} С ИММУННОЙ СИСТЕМОЙ МАКРООРГАНИЗМА ХОЗЯИНА – ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ

Федорова В.А.¹, Зайцев С.С.¹, Хижнякова М.А.¹, Ляпина А.М.¹, Саяпина Л.В.², Ляпина Е.П.³, Мотин В.Л.⁴

¹ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, Россия, Саратов

² Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Россия, Саратов

³ Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского, Россия, Саратов

⁴ University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

feodorovav@mail.ru

Белки Omp_{TIN} представляют собой группу протеаз, широко встречающихся у грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – возбудителей инфекционных болезней человека и животных с высоким уровнем заболеваемости и смертности [1]. Белки Omp_{TIN} играют важную роль во взаимодействии патогена и хозяина и считаются ключевыми факторами вирулентности и распространения в макроорганизме [2]. Целью настоящей работы явилось изучение потенциальной роли белков Omp_{TIN} в индукции иммунного ответа и определение локализации иммунореактивных эпитопов на молекулярном уровне.

В качестве модели использовали нуклеотидные и аминокислотные последовательности 5 белков семейства Omp_{TIN} - Pla (*Yersinia pestis*), PgtE (*Salmonella enterica*), SopA (*Shigella flexneri*), OmpT и OmpP (*Escherichia coli*). В качестве прототипного модельного таргетного антигена – рекомбинантный Pla (про-Omp_{TIN}), экспрессированный в *E. coli* и аффинно-очищенный как указано ранее [3]. Поиск специфических и кросс-реактивных эпитопов проводили методом пептидного иммуоферментного анализа (ELISA) с библиотекой синтетических пептидов (n=61) и панелью сывороток, содержащих антитела к про-omp_{TIN} [3], а также с применением современного биоинформатического пакета IEDB Analysis Resource v2.21.

Согласно полученным данным, для семейства Omp_{TIN} было предсказано 46 линейных и 24 конформационных иммунореактивных эпитопа. Среди них были отобраны высоко консервативные, неаллергенные, иммуногенные В-клеточные эпитопы. Пять специфических эпитопов (2, 6, 8, 10 и 11, соответствующие областям Pla 52–60, 146–150, 231–234, 286–295 и 306–311) могли бы стать первым выбором для разработки пептидных вакцин против инфекции, вызываемой гомологичным микроорганизмом. Три эпитопа (6, 8 и 10 - регионы 136–145, 227–230 и 274–285 про-Omp_{TIN}) были обнаружены у всех представителей белков Omp_{TIN} и, соответственно, являются перспективными таргетами для мультипатогенной вакцины против группы энтеробактериальных инфекций. Сравнительный анализ и 3D-моделирование аминокислотных последовательностей белков семейства Omp_{TIN} подтвердили их высокую перекрестную гомологию (56,0%-84,0%), поверхностную локализацию и возможное вовлечение в процессы взаимодействия патогена и хозяина.

Таким образом, впервые установлены конкретные эпитопы белков семейства Omp_{TIN}, вовлеченные в индукцию иммунного ответа макроорганизма хозяина, перспективные для разработки на их основе таргетной мультипатогенной пептидной вакцины против группы энтеробактериальных инфекций.

1. Gayet *et al.* (2017) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81.
2. Kukkonen *et al.* (2004) *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 7–14.
3. Feodorova *et al.* (2019) *Vaccines*. 7: 36.

ПАТОГЕН-ИНДУЦИРУЕМАЯ МОДИФИКАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ: ВЗГЛЯД С ПОЗИЦИИ ТРАНСКРИПТОМИКИ

Церс И.Д., Горшков В.Ю., Губаев Р.Ф., Гоголева Н.Е., Гоголев Ю. В.
Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Россия, Казань
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань
ivantsters@gmail.com

Ежегодно до половины урожая культурных растений (в т. ч. картофеля) теряется в результате деятельности пектобактерий – микроорганизмов, вызывающих заболевание мягкие гнили. Молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов физиологического преобразования растений в ходе развития этих заболеваний, остаются невыясненными. Чтобы выявить потенциальные «детали» таких механизмов нам было необходимо определить параметры репрограммирования транскриптома растений табака (*Nicotiana tabacum*) при развитии инфекции, вызываемой *Pectobacterium atrosepticum*. Мы концентрировали свое внимание на генах, продукты которых участвуют в модификации клеточной стенки в ходе развития типичной инфекции. Сотрудниками нашей лаборатории ранее была описана реакция растения на присутствие патогена, заключающаяся в высвобождении некоторых полисахаридов клеточной стенки в полость ксилемы. Было показано, что пектобактерии в сосудах растений образуют биопленко-подобные многоклеточные структуры, но матрикс этих структур состоит не из бактериальных полимеров, как в случае биопленок, а из полисахарида растения-хозяина – рамногалактуронана I. Причем этот полимер растение «собственными силами» выбрасывает из клеточной стенки в полость сосуда. При этом остается неясным, за счет каких ферментов и белков растения осуществляется такая реакция.

Мы провели транскриптомное профилирование интактных и инфицированных растений и выявили около 8500 дифференциально экспрессирующихся генов. Важная проблема транскриптомики связана со сложностью объективной физиологической интерпретации такого большого массива данных.

Поскольку гены апопластных белков табака ни в одной базе данных не представлены полноценно, для вычленения их из общего массива ДЭГ мы комбинировали несколько баз данных: KEGG, MapMan, CAZy и присвоили дополнительные аннотации всем ДЭГ. Мы обнаружили, что хотя экспрессия большинства генов апопластных белков при инфекции репрессируется, содержание транскриптов генов рамногалактуронанлиаз повышается в тысячи раз. Кроме того, индуцируется экспрессия генов экспансинов и ксилоглюкантрансликозилаз – эти ферменты разрыхляют целлюлозный каркас клеточной стенки и могут способствовать вымыванию фрагментов рамногалактуронана.

Таким образом, преобразование апопласта при развитии мягких гнилей определяется активацией экспрессии растительных (не только бактериальных) генов.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00194

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ БЕЛКОВ И БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ ДЛЯ ИХ РЕАЛИЗАЦИИ НА ПРИМЕРЕ БАКТЕРИЙ РОДА *Azospirillum*

Щеголев С.Ю.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
shegolev_s@ibppm.ru

Представлен краткий обзор концепции структуры белков, претерпевающей существенные изменения благодаря, в частности, активному развитию биоинформатических ресурсов. Обсуждаются выявленные ограничения традиционной парадигмы «структура-функция» [1] с принимаемой по умолчанию моделью фиксированной 3D-структуры белков, определяемой, главным образом, по результатам их рентгеноструктурного анализа. Однако с внедрением ЯМР-спектроскопии (и ряда других методов) в практику анализа белков в растворах и, в особенности, в результате разносторонних исследований протеомов методами биоинформатики, в нативных, способных к функционированию белках было выявлено наличие областей внутренней структурной неупорядоченности (ОВСН). Последние характеризуются отсутствием в них выраженных вторичных и третичных структур и могут охватывать как отдельные ограниченные участки молекул, так и структуру белка в целом [2]. Их роль простирается от гибких линкерных участков между белковыми доменами, самонастраиваемых центров многофункциональных взаимодействий с разнообразными внешними мишенями и сайтов связывания с модифицирующими ферментами, до шаперонов и областей, способных к индуцированным извне превращениям в фиксированные 2D- и 3D-структуры [3].

Для обнаружения и исследования ОВСН биоинформатика предлагает два взаимодополняющих подхода. Первый предоставляет набор предикторов, основанных на различных типах ОВСН, по аминокислотной последовательности белка [4, 5]. Отмечено [6], что преобладание в ее составе A, R, G, Q, S, P, E, K увеличивает вероятность неупорядоченности, в то время как сдвиг в сторону W, C, F, I, V, L, Y, N (в основном неполярных и гидрофобных) способствует появлению упорядоченных структур. Второй использует методы молекулярной динамики (см., например, [7]) с целью получения флюктуационных характеристик белков, выявления и визуализации спектра белковых конформаций, реализуемых в моделируемых физиологических условиях, по результатам экспериментального определения (либо моделирования) 3D структур белков с форматом файлов pdb, включающим координаты атомов.

Отмеченные выше биоинформатические ресурсы были использованы нами для оценки особенностей структуры белков, найденных в протеоме штамма *Azospirillum brasilense* Sp245, входящих в состав секреторной системы типа III механизма формирования и функционирования полярного жгутика и секреторной системы TAD, обеспечивающей формирование и функционирование бактериальных пилей. Степень их упорядоченности в пределах полных белковых ансамблей характеризовали с использованием зависимости СН-CDF [5] усредненных значений заряд-гидрофобность (CH) и кумулятивной функции распределения показателя неупорядоченности (CDF), определенных по аминокислотным последовательностям белков. Выявление ОВСН разных типов у индивидуальных белков проводили с помощью предикторов неупорядоченности из коллекции, отраженной в публикациях [4, 5]. Наборы конформаций белков и их динамические характеристики определяли методом [7] с использованием файлов pdb, полученных методом молекулярного моделирования по шаблону.

1. Chouard. (2011) *Nature*. 471: 151–153.
2. Dunker *et al.* (2008) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 756–764.
3. Hsu *et al.* (2013) *Protein Sci.* 22: 258–273.
4. Lieutaud *et al.* (2016) *Intrinsically Disord Proteins*. 4: e1259708 (1–33).
5. Machulin *et al.* (2019) *Int. J. Mol. Sci.* 20: 2377 (1–11).
6. Dunker *et al.* (2001) *J. Mol. Graphics Modell.* 19: 26–59.
1. Kuriata *et al.* (2018) *Nucleic Acids Res.* 46: W338–W343.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КОЛЕБАТЕЛЬНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ МИКРОБНЫХ РЕЗЕРВНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ КЛАССА СЛОЖНЫХ ПОЛИЭФИРОВ

Камнев А.А.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
aakamnev@ibppm.ru; a.a.kamnev@mail.ru

Многие микроорганизмы (МО) способны синтезировать и накапливать в клетках значительные количества (до ~90% от сухой биомассы) резервных веществ – сложных полиэфиров (polyesters) класса полигидроксиканоатов (ПГА) в виде внутриклеточных гранул. Эти биоразлагаемые (и, соответственно, экологически безопасные) биополимеры, помимо их биотехнологической значимости как заменителей традиционных пластиков, играют важную роль в выживании МО неблагоприятных условиях [1]. Состав ПГА у разных МО варьирует; к примеру, исследуемые во всем мире бактерии рода *Azospirillum*, среди которых много фитостимулирующих ризобактерий, перспективных для агробиотехнологии (см., например, [1–5] и цитированные в них работы), в качестве такого резервного вещества способны накапливать исключительно гомополимер – поли-3-гидроксibuтират (ПГБ) [1–3]. Это упрощает инструментальный анализ данного биополимера *in situ* (без его выделения из клеток), т.к. все регистрируемые различия в основном связаны с различным состоянием ПГБ (например, его степенью кристалличности, влияющей также на иные его свойства [6]).

В качестве наиболее информативных неразрушающих методов исследования, которые позволяют осуществлять экспресс-мониторинг накопления, количественное определение внутриклеточных ПГА и изучение некоторых их свойств *in situ* (без выделения из клеток), используется инфракрасная (ИК) фурье-спектроскопия [2–6] и в ряде случаев спектроскопия комбинационного рассеяния [7–9]. Эти современные молекулярно-спектроскопические методы инструментального анализа относятся к методам колебательной спектроскопии, т.к. оба связаны с регистрацией колебательных переходов функциональных групп (био)молекул, по энергии соответствующих ИК-диапазону, при взаимодействии электромагнитного излучения с веществом, но при этом основаны на различных физических принципах и дают взаимодополняющую информацию. Важным отличием данных методов является их высокая чувствительность к межмолекулярным и внутримолекулярным взаимодействиям.

В настоящей лекции обсуждаются примеры использования указанных методов для исследования скорости накопления ПГБ (и иных ПГА) растущей биомассой МО в различных условиях и перехода к расходованию запаса биополимера при недостатке питательных веществ; изменения степени кристалличности внутриклеточного биополимера в процессах его накопления (биосинтеза) и расходованию (путем ферментативного гидролиза); изменения в биосинтезе ПГБ мутантными штаммами с мутациями по генам липидного обмена (в том числе при образовании биопленок). Полученные данные дают представления о механизмах, лежащих в основе микробного синтеза резервных биополимеров класса ПГА, что важно для биотехнологии производства данных сложных полиэфиров и агробиотехнологии.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 17-08-01696-а

1. Obruca *et al.* (2018) *Biotechnol. Adv.* 36: 856–870.
2. Kamnev *et al.* (2008) *Microb. Ecol.* 56: 615–624.
3. Kamnev *et al.* (2012) *Appl. Soil Ecol.* 61: 213–216.
4. Tugarova *et al.* (2017) *J. Mol. Struct.* 1140: 142–147.
5. Kamnev *et al.* (2018) *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 193: 558–564.
6. Sedlacek *et al.* (2019) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103: 1905–1917.
7. Kamnev *et al.* (2001) *J. Mol. Struct.* 563–564: 199–207.
8. Tugarova *et al.* (2018) *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 192: 458–463.
9. Samek *et al.* (2016) *Sensors.* 16: 1808.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СОСТАВ МИКРОБОЦЕНОЗА РИЗОСФЕРЫ *Miscanthus x giganteus*

Бержанова Р.Ж.¹, Нуржанова А.А.², Муратова А.Ю.³, Бектилеуова Н.К.¹, Шарипбаева Г.¹,
Жумашева Ж.², Нурмагамбетова А.²

¹ Казахский Национальный университет им. Аль-Фараби, Казахстан, Алматы

² Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, Казахстан, Алматы

³ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, Саратов
ramza05@mail.ru

Выращивание биоэнергетического вида *Miscanthus x giganteus* (мискантус гигантский) для получения биомассы на загрязненных тяжелыми металлами землях, а также для улучшения экологических характеристик почв и предотвращения ее от эрозии представляется одним из приоритетных направлений в экологической биотехнологии. Растущая популярность мискантуса связана с высокой продуктивностью биомассы на загрязненных деградированных землях и способностью к фитостабилизации неорганических и органических поллютантов [1, 2].

Цель исследования – изучение микробного ценоза ризосферы мискантуса, произрастающего на загрязненной тяжелыми металлами почве (почва с территории Текелийского горно-обогатительного комплекса ОАО «Казцинк» г. Текели, РК, суммарный уровень загрязнения 20 мг/кг). Изучена общая численность гетеротрофных, аммонифицирующих, фосфатмобилизующих, спорообразующих и олигонитрофильных микроорганизмов в ризосфере мискантуса методом посева на плотные питательные среды [3, 4].

Установлено, что микрофлора, окружающая растения *M. x giganteus*, очень разнообразна и включает бактерии, грибы, дрожжи и актинобактерии. Высокий микробиологический фон был характерен для незагрязненной почвы. Так, в незагрязненной контрольной почве численность всех групп микроорганизмов в ризосфере *M. x giganteus* колебалась в пределах 10^3 - 10^6 КОЕ на 1 г почвы. Наблюдалась высокая численность микроорганизмов, усваивающих органические формы азота, их количество составило $33,8 \pm 2,1 \times 10^6$ КОЕ/г почвы. Бактерии актиномицетной линии выявлялись в количестве $13,1 \pm 1,7 \times 10^6$ КОЕ/г почвы. Высокая интенсивность развития бактерий этой группы свидетельствует об активности процесса минерализации органических веществ. Численность эколого-физиологических групп микроорганизмов в ризосфере мискантуса, произрастающего на загрязненной почве, была значительно ниже по сравнению с контролем, что свидетельствует о существенном изменении состава ризосферной микрофлоры. Так, из ризосферы были изолированы олигонитрофильные микроорганизмы – $11,2 \pm 1,2 \times 10^2$ КОЕ/г почвы (контроль $13,1 \pm 0,3 \times 10^5$ КОЕ/г) и спорообразующие – $8,1 \pm 0,23 \times 10^4$ КОЕ на 1 г почвы (контроль $13,1 \pm 1,7 \times 10^6$ КОЕ/г). Содержание микроскопических грибов составило $1,1 \pm 0,05 \times 10^3$ КОЕ/г (контроль $3,1 \pm 0,2 \times 10^4$ КОЕ/г). Фосфатрастворяющие бактерии в ризосфере мискантуса были обнаружены в малом количестве – $1,2 \pm 0,01 \times 10^2$ КОЕ/г почвы (контроль – $3,1 \pm 0,09 \times 10^3$ КОЕ/г).

Для выявления основных популяций микроорганизмов, устойчивых к Zn и Pb, определяющих эффективность использования процесса фитотехнологии, провели отбор микроорганизмов, проявляющих устойчивость к этим металлам. Скрининг проводили путем посева на среду LB, содержащую ионы одного из металлов ($ZnSO_4$ или $Pb(NO_3)_2$) в концентрации 0,5 ммоль/л. Выявлено количество устойчивых изолятов к $ZnSO_4$, что составило $27,5 \pm 0,13$ тыс. КОЕ/г почвы, а к $Pb(NO_3)_2$ – $5,1 \pm 0,13$ тыс. КОЕ/г почвы. Выделено 67 изолятов, устойчивых к тяжелым металлам, с которыми будет продолжена работа для выявления признаков, характерных для стимулирующих рост растений ризобактерий.

1. Nsanganwimana *et al.* (2004) *J. Environ. Management*. 143: 123–134.
2. Pidlisnyuk *et al.* (2014). *J. Envir. Protection*. 5: 723–730.
3. Нетрусов *и др.* Практикум по микробиологии. М.: Академия 2005, 608 с.
4. Звягинцев. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.: МГУ, 1991. С. 59–75.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Д

Dodd, 22

А

Абдульмянова, 77

Авдеева, 63, 85

Агеева, 53

Акимова, 6

Александрова, 19

Аленькина, 50

Андреева, 7

Андронов, 20

Апрятин, 41

Асатурова, 42

Б

Бабынин, 39

Багавова, 5

Бадеева, 39

Баймиев Ал.Х., 6, 76

Баймиев Ан.Х., 6

Бакаева, 33

Баландина, 21

Батаева, 7

Безматерных, 52

Бектилеуова, 91

Белимов, 22, 67

Берестецкий, 55, 56

Бержанова, 91

Боме, 82

Будаговская, 38

Будаговский, 38

Буданова, 79

Бурыгин, 9, 26, 54, 58

В

Васина, 23

Величко, 5, 62

Верещагин, 44

Владимирова А.А., 24

Владимирова А.А., 6

Власов, 44

Волохина, 15, 16, 81

Волошина, 39

Воробьев В.Н., 10, 53, 58

Воробьев Н.И., 84

Г

Гагкаева, 67

Ганнибал, 67

Герус, 8, 80

Гоголев, 19, 53, 58, 62, 67, 86, 88

Гоголева, 53, 62, 86, 88

Гончарова, 25

Горшков, 19, 53, 58, 62, 86, 88

Григорян, 55

Григорян, 7

Гринев, 21, 65

Грошева, 38

Грушевая, 80

Губаев, 53, 88

Гулий, 83

Гуменко, 6

Гусев, 81

Гуторова, 81

Д

Далинова, 55, 56

Даминова, 53

Денисова, 26

Дмитренко, 65

Доманская, 82

Дрозд Е.В., 60

Дубовик, 55, 56

Дубовский, 73

Дятлова, 34

Е

Евсеева, 26, 54

Евстигнеева, 12, 27, 45

Егоренкова, 69

Емельянов, 67

Ерошенко, 29

Ж

Жумашева, 91

З

Завильгельский, 13

Зайцев, 87

Закарьяева, 7

Закота, 8

Зеленева, 30

Зеленова, 31

Зиновкина, 22

И

Ибрахим, 11, 14, 57

Иванов, 56

Иголкина, 20

Исламов, 53, 58

Исмаилов, 86

К

Камнев, 24, 34, 90

Каневский, 12, 35

Капатева, 55

Карабаева, 83

Каргаполова, 9

Каримова, 40

Карпунина, 70

Кацы, 28, 32

Кенджиева, 33

Кенжегулов, 34

Кожемяков, 84

Кокоулин, 65

Колоколова, 82

Коннова, 11, 12, 14, 45, 57, 59, 64, 65, 71

Конончук, 8

Костина, 9

Кошелева, 35

Кузина, 33

Купряшина, 36, 37, 75

Л

Лаврентьева, 10

Лагодич, 60

Лактионов, 84

Латыпова, 76

Левченко, 8, 80

Липасова, 47

Ломоватская, 25

Лоскутов, 84

Любунь, 48

Ляпина А.М., 61

Ляпина Е.П., 87

М

Мавзютов, 76

Макарова, 67

Мамченкова, 24

Мандрик, 58

Маслова, 38

Матевосян С.Г.1, 11

Матора, 79

Мелькина, 13

Микшина, 53, 58

Миндубаев, 39
Мищенко, 12
Моисеева, 81
Мокеев, 28
Мотин, 61, 87
Муратова, 48, 91
Мухаммедов, 40
Мшенская, 41

Н

Нгун, 31
Никитин, 44
Никитина, 36, 37, 74, 75, 50
Нуржанова, 91
Нурмагамбетова, 91
О
Октябрьский, 49, 52

П

Павлова, 42
Падий, 66
Парфирова, 53, 62
Петрова Л.П., 28
Петрова М.О., 56
Петрова О.Е., 19, 53, 58, 62
Пирмагомедов, 84
Плешакова, 31
Плюта, 13, 47, 66
Поволоцкая, 23
Погребняк, 80
Позднякова, 21, 43
Полушкина, 29
Полюдова, 29
Пономарева, 36, 37, 75
Попова, 29
Пухальский, 84
Пылаев, 63, 85

Р

Рабинович, 23

Расулова, 40
Рафикова, 33
Рачилов, 73
Родина, 44
Романенко, 25
Рубижан, 55
Рыбальченко, 45

С

Савина, 70
Самойлова, 49
Самсонова, 64
Сафронова, 22
Саяпина, 87
Сигида, 11, 57, 64, 65, 71
Сидорин, 14
Сидорова, 13, 47, 66
Симонова, 46
Скрипк, 47
Смирнов, 56
Смирнова, 49, 52
Смолобочкин, 62
Сокольников, 23
Сохибназарова, 77
Стручкова, 41
Субботин, 46
Судникова, 30
Сунгурцева, 48
Сырова, 67

Т

Тамарова, 76
Тарасова, 62
Тендюк, 86
Тимуш, 68
Ткаченко, 9, 26, 54
Трегубова, 69
Тугарова, 24, 34
Тураева, 7
Турковская, 21, 43
Тюленев, 49

У

Ульянов, 15
Урядова, 70

Ф

Фадеев, 16
Федоненко, 5, 11, 14, 27, 45, 57, 64, 65, 71
Федорова А.Г., 50
Федорова В.А., 61, 87
Фокина, 70

Х

Хижнякова, 61, 87
Хмель, 13, 47, 66
Храпалова, 67

Ц

Церс, 53, 88
Цивилева, 72, 74

Ч

Чумаков, 15, 16, 17, 81

Ш

Шарипбаева, 91
Шапошников, 22, 67
Шаталова, 73
Шатерников, 74, 75
Швец, 76
Шевченко, 13
Шпатова, 73
Шухратова, 40

Щ

Щеголев, 79, 89

Ю

Юдакова, 15
Юсупов, 77

Научное издание

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

**IX Всероссийская конференция молодых ученых
Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений
с окружающей средой**

**14–18 октября 2019 г.
Саратов**

Подписано в печать 01.09.2019. Формат 60×84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.

Печать офсетная.

Усл. п. л. 4,76. Тираж 150 экз. Заказ № 1894.

ООО «Издательский Центр Наука»
г. Саратов, ул. Пугачевская, д. 117, к. 50
Отпечатано в ООО «Автограф»,
г. Саратов, ул. Чернышевского, 94 г