



PLAMIC 2024



МАТЕРИАЛЫ

IV Международной научной конференции
«РАСТЕНИЯ И МИКРООРГАНИЗМЫ: БИОТЕХНОЛОГИЯ БУДУЩЕГО»

и

III Всероссийской конференции
с международным участием
«МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ»



Байкальск, 15–22 сентября 2024 г.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии
Институт биохимии и генетики РАН
Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН
Байкальский государственный природный биосферный заповедник

PLAMIC2024

Материалы
IV Международной научной конференции
**«РАСТЕНИЯ И МИКРООРГАНИЗМЫ:
БИОТЕХНОЛОГИЯ БУДУЩЕГО»**

и

III Всероссийской конференции с международным участием
**«МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ»**

Байкальск, 15–22 сентября 2024 г.



УДК 58(063)
ББК 28.5л0
P44

Ответственный редактор
И. А. Тихонович

Редакционная коллегия:
Л. А. Беловежец, Г. Л. Бурьгин, З. Р. Вершинина, Л. А. Максимова,
Ю. А. Маркова, Н. В. Филинова, В. Е. Цыганов

P44 **PLAMIC2024** : материалы IV Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» и III Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». Байкальск, 15–22 сентября 2024 г. / отв. ред. И. А. Тихонович. – Иркутск : Издательство ИГУ, 2024. – 444 с.
ISBN 978-5-9624-2307-4

В докладах представлены новейшие результаты российских и зарубежных ученых, посвященные современным исследованиям в области генетики, физиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов, а также растительно-микробных взаимодействий. Рассматриваются вопросы современных методов селекции, генетической и клеточной инженерии, геномного редактирования растений, а также симбиотические взаимодействия растений и микроорганизмов. Обсуждается возможность использования биотехнологических методов для решения экофизиологических проблем растениеводства. Большое внимание уделяется вопросам возможности управления адаптационным потенциалом микроорганизмов для последующего практического использования в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве.

Предназначено для специалистов в области генетики, физиологии и биохимии растений, растительно-микробных взаимодействий, медицинской микробиологии, почвенной микробиологии, физиологии и биохимии стресса, молекулярной биологии, генетики и экологии, а также для студентов и аспирантов биологических специальностей высших учебных заведений.

УДК 58(063)
ББК 28.5л0

ISBN 978-5-9624-2307-4

© СИФИБР СО РАН, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

IV Международная научная конференция «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2024

Секция 1. Генетика, физиология и биотехнология растений

Арабова Л. И., Чумикина Л. В., Топунов А. Ф. Роль совместного действия фитогормонов абсцизовой и индолилуксусной кислот при прорастании семян пшеницы и адаптации к стрессу	17
Артемюк А. М., Творогова В. Е., Лутова Л. А. Получение линий люцерны (<i>Medicago truncatula</i>) с потерей функции гена <i>MtWOX2</i>	20
Баймухаметова Э. А., Мусин Х. Г., Швец Д. Ю., Кулуев Б. Р. Создание генно-инженерных конструкций для CRISPR/Cas редактирования гена 1-feh <i>Cichorium intybus</i> L.	21
Березина Е. В., Ларина М. В., Вольнец Г. А., Сёмин А. А., Брилкина А. А. Влияние углеводного состава питательной среды на содержание фенольных соединений в каллусной и суспензионной культурах <i>Vaccinium corymbosum</i> L.	22
Бледных О. В., Роденко Н. А., Глушечков В. А., Дегтева Ю. В. Влияние импульсного магнитного поля высокой напряженности на образование супероксид-аниона этиолированными и неэтиолированными растениями пшеницы мягкой	24
Борхерт Е. В., Пушкова Е. Н., Бодров Я. В., Мазина А. С., Рыбакова Т. Ю., Мельникова Н. В., Дмитриев А. А. ДНК-маркеры для определения пола у тополей секций <i>Aigeiros</i> Duby и <i>Tacamahaca</i> Sprach	26
Гайнуллина К. П., Заикина Е. А., Кулуев Б. Р. Роль гена транскрипционного фактора <i>FUS3</i> в накоплении запасных белков семян у гороха	28
Ерёмин Д. И., Любимова А. В. Генетическая солеустойчивость перспективных и местных сортов овса селекции НИИСХ Северного Уралья	31
Ефремова Е. П., Творогова В. Е., Лутова Л. А. Гены <i>WOX</i> современной клады и их влияние на регенерацию <i>in vitro</i>	33
Жернова Д. А., Архипов А. А., Пушкова Е. Н., Дмитриев А. А., Мельникова Н. В. Идентификация генов семейства <i>CESA</i> с использованием высококачественных сборок геномов льна	34
Жуков В. А., Зорин Е. А., Сулима А. С., Жернаков А. И., Кузьмина Д. О., Ракова В. А., Гордон М. Л., Романюк Д. А., Клюкова М. С., Ахтемова Г. А., Кулаева О. А., Штарк О. Ю., Тихонович И. А. Функциональная геномика симбиозов гороха посевного (<i>Pisum sativum</i> L.)	37

Злобина Ю. А., Кононова О. Е. Стерилизация семян сои и льна при введении в культуру <i>in vitro</i>	39
Иванова А. В., Немцова Ю. А., Пирогова П. А., Воденев В. А., Гринберг М. А. Сопоставление радиочувствительности физиологических и морфометрических процессов у растений пшеницы	40
Кибальник О. П. Наследование засухоустойчивости у гибридов F1 сорго на основе A2, A3, A5 типов цитоплазм	42
Козарь Е. В., Домблидес Е. А. Совершенствование технологии получения удвоенных гаплоидов масличного рапса с целью получения гербицидоустойчивых ДН-линий	44
Кулуев А. Р., Матниязов Р. Т., Чемерис А. В. Секвенирование и аннотирование хлоропластного генома редких и малоизученных видов пшениц ряда <i>turgidum-aestivum</i>	47
Кучарова Е. В., Егоров Ю. А., Ксенофонтов Д. Е., Заблоцкая А. П., Охлопкова Ж. М. Введение эндемика Центральной Якутии <i>Thermopsis lanceolata</i> R. Br. Subsp. <i>Jacutica</i> (Czeffr.) Schreter в культуру <i>in vitro</i>	49
Ламаханова Б. Ж., Ламажапова Г. П., Сынгеева Э. В. Технология извлечения биологически активных веществ из листьев смородины черной	51
Любимова А. В., Ерёмин Д. И., Таутекенова А. К., Фомина М. Н. Связь иммуногенности авенинов овса посевного с аллельным составом авенин-кодирующих локусов	54
Мальков Д. И., Бахтиярова А. Х., Бабич О. О. Антиоксидантная активность фенольных экстрактов макрородорослей	56
Миндубаев А. З., Клементьев С. В., Сидоров М. Ю., Гоголашвили Э. Л., Гостева А. Н. Биовыщелачивание сподумена двумя штаммами <i>Aspergillus niger</i>	58
Миндубаев А. З., Клементьев С. В., Кобелев А. В., Минзанова С. Т. Активность лектинов <i>Aspergillus niger</i>	60
Михайлова Е. В., Гарафутдинов Р. Р., Слинкин А. А. Культуры волосовидных корней растений рода <i>Withania</i> – источник биологически активных веществ для фармацевтической и пищевой промышленности	62
Михайлова Е. В., Хуснутдинов Э. А., Панфилова М. А. Возможности применения векторов на основе растительных вирусов для геномного редактирования <i>in planta</i>	63
Немцова Ю. А., Иванова А. В., Печёрина А. А., Агеева М. Н., Воденев В. А., Гринберг М. А. Влияние низкодозового ионизирующего излучения на сигнальные системы и вызываемые ими реакции фотосинтеза у растений табака	64
Павличенко В. В., Протопопова М. В. Изменение солеустойчивости тополя в результате агробактериальной трансформации генами <i>HvDhn5</i> и <i>TaWCS120</i>	66
Поценковская Э. А., Творогова В. Е., Брынчикова А. В., Лутова Л. А. Влияние гомолога LEC1 и его партнеров у <i>Medicago truncatula</i> на развитие соматических эмбрионов	69

Рахматуллина И. Ф., Кулуев Б. Р. Особенности введения в культуру <i>in vitro</i> и индукции органогенеза сапожниковии растопыренной	70
Симонова В. Ю., Поценковская Э. А., Творогова В. Е., Лутова Л. А. Анализ эффективности работы <i>RUBY</i> как репортера в системе трансформации <i>Pisum sativum</i>	72
Таутекенова А. К., Ерёмин Д. И. Полевая оценка коллекции овса на устойчивость к корончатой и стеблевой ржавчинам в условиях Северного Зауралья	73
Турба А. А., Новаковский Р. О., Зубарев Ю. А., Мельникова Н. В., Дмитриев А. А. Идентификация и анализ генов <i>SAD, ADS, FAD, FAT</i> и <i>KAS</i> , играющих ключевую роль в биосинтезе жирных кислот плодов <i>Hippophae rhamnoides L.</i>	75
Федорова О. А., Гродецкая Т. А., Евлаков П. М., Гусев А. А., Захарова О. В. Аспекты использования наночастиц металлов в технологии клонального микроразмножения древесных растений	77
Федотов П. А., Любушкина И. В. Оценка влияния состава среды и физиологического состояния экспланта на процессы формирования и развития каллусов у озимой и яровой пшеницы <i>Triticum aestivum L.</i>	80
Филинова Н. В., Алексеев М. А. Изучение новых кремнийорганических стимуляторов роста растений	82
Чумаков М. И., Фадеев В. В., Фадеева Ю. В., Моисеева Е. М. Биотехнологии на основе механизмов гиногенеза и партеногенеза у кукурузы: анализ генов и белков	85
Швец Д. Ю., Мустафина А. Д., Мусин Х. Г., Кулуев Б. Р. Природный трансген <i>trnS</i> для повышения продуктивности и стрессоустойчивости растений <i>Nicotiana tabacum L.</i>	87
Шевелева И. С. Влияние состава питательной среды на соматический эмбриогенез кедрового стланика (<i>Pinus pumila</i>)	88
Шенаршеева А. А., Сынгеева Э. В., Ламажапова Г. П. Технология экстракта из листьев облепихи крушиновидной	90

Секция 2. Генетика, физиология и биотехнология микроорганизмов

Ананьина Л. Н., Горбунов А. А., Шестакова Е. А. Влияние солёности среды на метаболизм клеток штамма <i>Glutamicibacter sp. SMB32</i>	93
Бакулина А. В., Бессолицина Е. А., Широких И. Г. ПЦР-скрининг бактерий рода <i>Streptomyces</i> для целей агробiotехнологии	94
Батаева Ю. В., Григорян Л. Н. Биотехнологические свойства и состав вторичных метаболитов некоторых штаммов актинобактерий и цианобактерий	97
Белоусов Д. С., Малков Ю. А., Беловежец Л. А. Технология глубинного культивирования мицелия высших базидиальных грибов	99
Большакова Д. В., Максимова А. М., Мандрик-Литвинкович М. Н., Степанова Т. Л., Филипчук Т. А., Коломиец Э. И. Анализ основных функциональных групп микроорганизмов почвы при выращивании голубики высокорослой	101

Буденкова Е. А., Костюшина Н. В., Каширских Е. В., Бабич О. О. Оптимизация условий культивирования <i>Desmodium communis</i>	103
Бульмакова Д. С., Сокольников Л. В., Сулейманова А. Д. Роль бактериальных штаммов <i>Pantoea brenneri</i> в повышении биодоступности почвенного фосфора и защите растений от фитопатогенов	106
Бурьгин Г. Л., Астанкова А. С., Филипьевичева Ю. А. Оценка влияния нанокластеров на резистентность бактерий к тяжёлым металлам и антибиотикам	108
Вершинина З. Р., Чубукова О. В., Хакимова Л. Р., Бигалеева А. Ш. Штаммы псевдомонад, вырабатывающие 2-гексил,5-пропилрезорцин, как агенты биоконтроля грибных фитопатогенов	110
Гаврилова Е. А., Монира Я. М., Ежкова А. М., Ежков В. О., Никитина Е. В., Яруллина Д. Р., Каюмов А. Р. Разработка синбиотического препарата на основе пробиотических лактобактерий	112
Гайсина Э. М., Кырова Е. И., Орлов Ю. Л., Игнатов А. Н. Эволюция белков, похожих на активаторы транскрипции (TALEs) у фитопатогенных бактерий и других организмов	114
Галуза О. А., Эль-Регистан Г. И., Коротков Н. А., Николаев Ю. А. Новые подходы к созданию биопрепаратов молочнокислых бактерий	115
Герасимчук А. Л., Сысоева А. Н., Ивасенко Д. А. Микробная биодеградация отходов производства пальмового масла	118
Гоголев Ю. В., Гоголева Н. Е., Коннова Т. А., Осипова Е. В., Хамза Хамо, Балкин А. С. Транскриптомный контекст и метатранскриптомика патосистем	121
Голубев Д. М., Нестеркина Д. Д., Коробейникова А. С., Сескутова Е. А., Глинская Е. В., Нечаева О. В., Иржанова Д. М., Нечев В. Н. Субстратный спектр аборигенных углеводородокисляющих бактерий, выделенных из антропогенно нарушенных почв	124
Дворянинова Е. М., Сигова Е. А., Пушкова Е. Н., Павлова В. А., Каплун А. М., Рожмина Т. А., Жернова Д. А., Мельникова Н. В., Дмитриев А. А. Пангеном грибного патогена льна <i>Colletotrichum lini</i>	126
Евдокимова О. В., Семенчукова Е. А., Николайчик Е. А. Секретируемые деполимеразы у бактериальных фитопатогенов группы <i>Bacillus pumilus</i>	127
Егорова Д. О., Кирьянова Т. Д., Королев Н. А. Генетическая основа биотехнологического потенциала аэробных штаммов-деструкторов ПХБ	129
Ертилецкая Н. Л., Суханова А. А., Бояндин А. Н. Продукция молочной кислоты штаммом <i>Weizmannia coagulans</i> при различных начальных концентрациях глюкозы	132
Жуланова Н. С., Тюленев А. В., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. Изменение уровней глутатиона у штаммов <i>Escherichia coli</i> с множественной антибиотикоустойчивостью при действии хлорамфеникола	134

Ивасенко Д. А., Сысоева А. Н., Трифонов А. А., Нурхайати Э., Багастья А. Й., Тангаху Б. В., Вармадеванти И., Герасимчук А. Л. Выделение деструкторов пальмового масла из жидких отходов предприятий по переработке масличной пальмы	137
Калашникова Т. В., Сутормина Л. В., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. Уровень цистеина и глутатиона в клетках <i>Escherichia coli</i> в условиях голодания по сульфату	139
Камнев А. А. Исследование биотехнологически важных структурных и физико-химических превращений в клетках бактерий: молекулярно-спектроскопические подходы	142
Колышклина С. В., Новичихина Д. А., Трizza Е. Ю., Лисовская С. А., Хабибрахманова А. М., Латыпова Л. З., Курбангалieва А. Р., Каюмов А. Р. Производные пятичленных <i>o</i> - и <i>n</i> -гетероциклов для подавления грибковой микрофлоры на различных поверхностях	143
Крюков А. А., Юрков А. П., Горбунова А. О., Кудряшова Т. Р., Горенкова А. И. Создание базы данных генетических последовательностей для идентификации грибов арбускулярной микоризы	145
Кузнецова М. В., Кузнецова Т. Н., Фархутдинов Р. Г. Роль эндوفитного штамма <i>Bacillus subtilis</i> ЗН и его метаболитов в контроле фитопатогенных грибов	146
Купцов В. Н., Левченко Д. Д., Харитончик А. Р., Степанова Т. Л., Коломиец Э. И. Устойчивость бактерий-антагонистов к минеральным удобрениям и пестицидам как фактор повышения эффективности их использования в интегрированных системах защиты растений	149
Лутфуллина Г. Ф., Абубакирова А. М. Анализ экспрессии генов антимикробных липопептидов <i>Bacillus subtilis</i> GM5	151
Маградзе Е. И., Кузнецова В. А. Оценка влияния бактериального удобрения на основе молочной сыворотки, содержащего стрептомицеты, на выращивание цветочной рассады	154
Макарова Л. Е., Маркова Ю. А., Зайцева Ю. В., Константинов Ю. М., Горбенко И. В., Карпова М. С., Бизиков П. А., Васильев И. А. Возможная функциональная роль эндوفитных бактерий в прикорневой среде растений гороха после их перемещения из корней в ризосферу	156
Мионов В. В. Исследование эффекта высокой концентрации и изменения вклада анаэробного метаболизма при интродукции гидролитически активных микроорганизмов в компостируемые пищевые отходы	158
Мионова А. В., Федорова М. С., Каюмов А. Р., Трizza Е. Ю. Изменение чувствительности <i>K. pneumoniae</i> в смешанной культуре <i>Staphylococcus aureus</i> – <i>Klebsiella pneumoniae</i> и в присутствии внеклеточных метаболитов <i>S. Aureus</i>	160
Муратова А. Ю., Голубев. С. Н., Сунгурцева И. Ю. Биодegradация ПАУ ризобиями в присутствии тяжелых металлов	162
Назаров П. А., Каракозова М. В. Эндوفитные микроорганизмы как перспективный источник для поиска новых антибиотиков	164

Несмеянова В. С., Шаньшин Д. В., Волосникова Е. А., Щербаков Д. Н. Получение рекомбинантного домена III (DIII) структурного гликопротеина E вируса лихорадки Западного Нила, синтезируемого в бактериальных клетках	166
Николаев Ю. А., Дёмкина Е. В., Галуза О. А., Лойко Н. Г., Канапаций Т. А., Борзенков И. А., Перминова И. В., Хрептугова А. Н., Эль-Регистан Г. И. Биосовместимые гели для длительного хранения и улучшения технологических свойств препаратов живых бактерий	168
Позднякова Н. Н., Бабичева Т. С., Чернова Д. С., Шиповская А. Б. Трансформация полимеров хитозана аскомицетами	170
Попова Т. М., Николаева А. Н., Лутфуллина Г. Ф., Марданова А. М. Ростостимулирующие и фунгистатические свойства ризосферных <i>Bacillus</i>	172
Приставка Е. О., Шадрина Е. С., Левчук А. А., Беловежец Л. А. Изучение способности бактерий утилизировать имазамокс	175
Пьянкова А. А., Краева А. В., Плотникова Е. Г. Ризосферные бактерии, эффективно утилизирующие фталаты в условиях засоления	177
Розова О. Н., Бут С. Ю., Шавкунов К. С., Мельников О. И., Хмеленина В. Н., Мустахимов И. И. Анализ экспрессионного профиля штамма-продуцента фумарата облигатного метанотрофа <i>Methylotuvimicrobium alcaliphilum</i> 20Z-3E	180
Рудакова Н. Л., Хасанов Д. И. Оценка эффективности рекомбинантных штаммов-продуцентов металлоэндопептидазы <i>Bacillus pumilus</i>	182
Сабирзянов Ф. А., Хованкина А. В. Технология скрининга продуцентов секретируемых белков, основанная на дрожжевом α -факторе и феромоновом сигнальном пути	185
Савиных Г. А., Габриелян Д. А., Габриелян А. К., Лось Д. А. Экспериментальное определение толщины рабочего слоя плоскостных фотобиореакторов для интенсивного культивирования микроводорослей	186
Санеева Ю. Н., Безлер Н. В. Влияние культур рода <i>Bacillus</i> на развитие болезней листового аппарата аппарата свеклы	188
Свиридов А. А., Габриелян Д. А. Солнечный фотобиореактор для производства ценной биомассы микроводорослей в регионах с повышенной инсоляцией	190
Сокольников Л. В., Беркутова Е. С., Бульмакова Д. С., Сулейманова А. Д. Получение и характеристика штаммов <i>Pantoea brenneri</i> , экспрессирующих флуоресцентный белок	193
Соляникова И. П., Сузина Н. Е., Абашина Т. Н., Поливцева В. Н., Делеган Я. А., Иминова Л. Р., Асфха З. А., Артемьева И. А., Травкин В. М. Актинобактерии: генетика, биохимия, перспективы биотехнологического применения	195
Сулейманова А. Д., Пудова Д. С., Сокольников Л. В., Шарипова М. Р. Геномные детерминанты <i>Pantoea brenneri</i> , обуславливающие биоконтрольные свойства бактерии	196
Сутормина Л. В., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. Сравнение чувствительности к ципрофлоксацину и уровня цистеина у разных штаммов <i>E. coli</i>	199

Тюленев А. В., Жуланова Н. С., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. Влияние экзогенного цистина на продукцию сероводорода у штаммов <i>Escherichia coli</i> , дефектных по синтезу и деградации цистеина	201
Федорова М. С., Муталлапова Г. И., Ядыкова Л. Л., Тризна Е. Ю., Каюмов А. Р. Новые литические бактериофаги <i>Pseudomonas aeruginosa</i> из водоемов Поволжья	203
Хасанов Д. И., Рудакова Н. Л., Данилова Ю. В., Васильева Ю. А., Гильмутдинова А. И., Шарипова М. Р. Инактивация гена металлопротеиназы <i>Bacillus pumilus</i> методом CRISPR/Cas9 редактирования генома	204
Шарангович М. А., Николайчик Е. А. Две пектиназы <i>P. versatile</i> 3-2, PелI и PелA, важные на разных этапах пектинолиза	206
Ядыкова Л. Л., Баязитова Л. Т., Каюмов А. Р., Тризна Е. Ю., Зыкова Д. А. Анализ наличия генов устойчивости к антибиотикам у бактерий группы <i>Escherichia coli</i> с фенотипической резистентностью к антимикробным препаратам	208
Яруллина Д. Р., Гаврилова Е. А., Ежкова А. М., Ежков В. О., Никитина Е. В., Волков Р. А., Каюмов А. Р. Использование новых минерально-пробиотических кормовых добавок для повышения биологического потенциала мясной птицы	210

Секция 3. Растительно-микробные системы

Баенгуев Б. А., Белоголова Г. А., Гордеева О. Н. Поведение As и биогенных элементов P и Si под воздействием ризобактерий в системе «почва – растение»	213
Белимов А. А., Шапошников А. И., Азарова Т. С., Вишневская Н. А., Сексте Э. А., Шахназарова В. Ю., Бутин А. А., Лебединский М. И., Юзихин О. С., Гоголев Ю. В. Биоконтрольный эффект АБК-утилизирующей ризобактерии <i>Rhodococcus</i> sp. P1Y при инфицировании проростков подсолнечника АБК-продуцирующим грибом <i>Botrytis</i> sp. ВА3	216
Васильев И. А., Кареева М. С., Казаева А. С., Кривенко Д. А., Маркова Ю. А. Перспективы использования ризосферных микроорганизмов приольхонских степей как стимуляторов роста сельскохозяйственных растений	217
Гальперина А. Р., Бареева А. Ш., Сопрунова О. Б. Роль ризосферных энтеробактерий в устойчивости растений к солевому стрессу	219
Горшков А. П., Кусакин П. Г., Цыганова А. В., Цыганов В. Е. Сравнительный анализ влияния пестицидов на структуру клубеньков гороха (<i>Pisum sativum</i> L.)	221
Григориади А. С., Хамидуллин А. Р., Фархутдинов Р. Г. Микроорганизмы цикла азота в ризосфере растения-фиторемедианта <i>Helianthus annuus</i> L. в условиях нефтяного стресса и биоремедиации	224
Данилова Ю. В., Васильева Ю. А., Гильмутдинова А. И., Хасанов Д. И., Рудакова Н. Л., Шарипова М. Р. Оценка потенциала ризосферного изолята в качестве фитопротекторного штамма	226

Зенкова А. А. Исследование процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы из продукта азотнокислой обработки мискантуса гигантского	229
Ивойлова Т. М., Деханова Е. Н., Елистратова А. А., Ширшикова Т. В., Матросова Л. Е., Шарипова М. Р., Хияс И. В. Агробиотехнологический потенциал эндолитного штамма <i>Nocardia mangyaensis</i> NH1	231
Иткина Д. Л., Дроздова М. С. <i>Bacillus ginsengihumi</i> в качестве основы комбинированного биоудобрения	233
Кайгородова И. М., Козарь Е. Г., Енгальчева И. А., Ушаков В. А. Влияние вторичных метаболитов на иммунный ответ растений семейства Fabaceae при праймировании семян	235
Киенская К. И., Матвеева Д. А., Бобровницкий С. К., Буторова И. А. Влияние рибавирина на микрофлору почвы, прорастание семян и рост растений	238
Козарь Е. Г., Енгальчева И. А., Ванюшкина И. А., Синиченко Н. А. Состав и патогенность микобиоты пораженных растений томата в условиях Приморского края	240
Кудряшова Т. Р., Крюков А. А., Юрков А. П., Горбунова А. О., Лактионов Ю. В. Экспрессия генов аквапоринов у <i>Medicago lupulina</i> в симбиозе с <i>Rhizophagus irregularis</i>	243
Кузнецова В. Е., Матвеева Е. А., Беловежец Л. А. Поиск эффективных собиоцидов для защиты древесины	246
Макарова Л. Е., Бизиков П. А., Ищенко А. А., Олейников Ю. Б. Изучение влияния нафталина на ростовые процессы растений гороха и на взаимодействия их с симбиотическими микроорганизмами	248
Минеев Я. П., Мусин Х. Г., Кулуев Б. Р. Эффективность микоризации трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией генов <i>NtEXPA5</i> , <i>AtGSTF11</i> и <i>ARGOS-LIKE</i>	250
Курынцева П. А., Проневич Н. А., Селивановская С. Ю. Увеличение температуры: влияние на почвенное микробное сообщество, изменение эффективности улавливания углекислого газа растениями-сидератами	252
Лебединский М. И., Шахназарова В. Ю., Сырова Д. С., Вишневская Н. А., Шапошников А. И., Бородина Е. В., Струнникова О. К., Белимов А. А. Биоконтрольное влияние ризобактерии <i>Pseudomonas fluorescens</i> 2137 на взаимодействие фитопатогенного гриба <i>Fusarium culmorum</i> и растений ячменя	254
Лифшиц С. Х., Глянцева Ю. С., Чалая О. Н., Зуева И. Н. Влияние биологических факторов на эффективность очистки почв от нефтезагрязнений	256
Малева М. Г., Борисова Г. Г., Ахамуэфуле К. Ч., Салата А., Дарказанли М. Оценка биофортификационного потенциала Zn-солубилизирующих PGP-ризобактерий при внекорневой подкормке <i>Pisum sativum</i> L. разными формами йода	258
Мартыненко Е. В., Высоцкая Л. Б., Рябова А. С., Кузьмина Л. Ю., Гаффарова Э. Р., Кудоярова Г. Р. Влияние бактерий, катаболизирующих АБК, на рост растений при плотном посеве	261

Мухина К. С., Козарь Е. Г., Ветрова С. А. Фитопатогенные микробиоты рода <i>Fusarium</i> на культуре свеклы столовой	263
Назаров А. В., Краева А. В., Нечаева Ю. И., Корсакова Е. С. Бактерии-деструкторы дибутилфталата ризосферы растений, произрастающих на территории разработок Верхнекамского месторождения солей	265
Николаева А. А., Хворова С. А., Лутфуллин М. Т., Вологин С. Г., Марданова А. М. Исследование вирулентности фитопатогенных <i>Fusarium</i>	267
Николайчик Е. А., Вычик П. В., Дигрис А. В., Дувалов Е. И., Скакун В. В. Проблемы аннотации бактериальных геномов и растительно-микробные взаимодействия	269
Нурминская Ю. В., Каропова М. С., Аюшеева Н. Б., Васильев И. А., Маркова Ю. В. Характеристика штамма <i>Lysobacter</i> sp., выделенного из ризосферы эндемичного растения прибайкалья <i>Hedysarum zundukii</i> (Fabaceae)	272
Парфилова О. И., Петрова О. Е., Сыромятникова Е. Д., Смолочкин А. В., Горшков В. Ю. Экстраклеточные низкомолекулярные фосфонаты <i>Pectobacterium atrosepticum</i> как факторы, определяющие состояние растительно-микробной патосистемы	274
Петренко В. А., Лебедева М. А., Лутова Л. А. Изучение экспрессии генов, контролирующих защитные реакции, при взаимодействии люцерны <i>Medicago truncatula</i> азотфиксирующими бактериями ризобиями	276
Петрушин И. С., Маркова Ю. А., Мориц А. С., Гутник Д. И., Филинова Н. В. Исследование влияния биостимулятора <i>Rhodococcus qingshengii</i> VKM Ac-2784D на микробиом картофеля	278
Рассохина И. И. Морфологические и продуктивные параметры <i>Hordeum vulgare</i> L. при действии суспензии штамма <i>Pseudomonas</i> sp. GEOT18	280
Рубцова Д. Н., Лебедева М. А., Лутова Л. А. Исследование генов <i>TOO MUCH LOVE</i> в развитии клубеньков у люцерны	282
Рукавцова Е. Б., Захарченко Н. С., Шмарев А. Н., Креславский В. Д., Звонарев А. Н., Пунтус И. Ф., Филонов А. Е., Ариповский А. В. влияние препарата Абиопептид® и колонизации ассоциативными микроорганизмами на рост растений и их устойчивость к стрессам	284
Рябова А. С., Кузьмина Л. Ю., Гильванова Е. А., Мартыненко Е. В., Высоцкая Л. Б. Новые штаммы рода <i>Pseudomonas</i> , обладающие способностью метаболизировать АБК и активировать рост растений пшеницы	285
Сигва Е. А., Дворянинова Е. М., Пушкова Е. Н., Жернова Д. А., Каплун А. М., Павлова В. А., Рожмина Т. А., Мельникова Н. В., Дмитриев А. А. Транскриптомный анализ штаммов <i>Colletotrichum lini</i> различной вирулентности при заражении льна	286
Субботин А. М., Тимофеев В. Н. Влияние биопрепаратов на основе бактерий из многолетнемерзлых обводнённых пород в комбинации с протравителем семян Протега Макс на урожайность яровой пшеницы	288

Тендюк Н. В., Дьяконова А. А., Петрова О. Е., Мухаметзянов Т. А., Макшакова О. Н., Горшков В. Ю. Роль Svx-металлопротеаз в развитии инфекционных процессов, индуцируемых фитопатогенными пектолитическими бактериями	290
Тихонова Т. О., Козарь Е. Г., Енгальчева И. А., Степанов В. А. Симптомы проявления и вредоносность шерстистой мягкой гнили (<i>Rhizopus stolonifer</i>) корнеплодов моркови столовой в условиях <i>in vitro</i>	293
Турковская О. В., Голубев С. Н., Дубровская Е. В., Бондаренкова А. Д., Муратова А. Ю. Коллекция ризосферных микроорганизмов как основа для исследования растительно-микробных взаимодействий	295
Федорова О. А., Санеева Ю. Н., Безлер Н. В. Перспективы использования ризобактерий в технологии возделывания сахарной свеклы	298
Фролова С. Л., Козарь Е. Г., Бондарева Л. Л. Получение и оценка на устойчивость к сосудистому бактериозу (<i>Xanthomonas campestris</i> dows.) удвоенных гаплоидов капусты белокочанной	301
Худокормов А. А., Шевченко Е. А., Самков А. А., Волченко Н. Н., Моисеева Е. В., Круглова М. Н. Оценка влияния суспензий <i>Chlorella vulgaris</i> D1 и D2 на прорастание и энергию всхожести кресс-салата, огурца, редиса и томата	303
Худяева М. В., Чеботарь В. К., Баганова М. Е., Келейникова О. В., Ерофеева А. В., Юзихин О. С., Чижевская Е. П., Костицын Р. Д., Хонина О. В., Лапенко Н. Г., Тихонович И. А. Сельскохозяйственный потенциал эндофитных бактерий засухоустойчивых растений	306
Цыганов В. Е., Китаева А. Б., Кусакин П. Г., Горшков А. П., Киричек Е. А., Цыганова А. В. Динамика тубулинового цитоскелета при развитии азотфиксирующих клубеньков бобовых растений	308
Цыганова А. В., Селиверстова Е. В., Цыганов В. Е. Симбиотический интерфейс апопласта в клубеньках бобовых	310
Чеботарь В. К., Худяева М. В., Пищик В. Н., Чижевская Е. П., Баганова М. Е., Келейникова О. В., Фесенко И. А., Мамаева А. С., Тихонович И. А. Микробиомы засухоустойчивых растений для создания полифункциональных комплексных микробиологических препаратов для растениеводства	313
Чижевская Е. П., Чеботарь В. К., Худяева М. В., Кичко А. А., Лапенко Н. Г., Костицын Р. Д., Хонина О. В., Тихонович И. А. Специфичность эндофитных микробиомов засухоустойчивых растений полупустынной степи Ставропольского края	316
Чубенко Т. В., Борисова А. Р., Рысцова Е. О. Инновационная упаковка из растительных компонентов для продуктов животного происхождения	319
Шруб Е. В., Колубако А. В., Григорьева Н. А., Николайчик Е. А. Особенности ответа растений картофеля на внедрение <i>Pectobacterium versatile</i>	321
Юзихин О. С., Шапошников А. И., Бутин А. А., Викторов Н. Б., Камнев А. А., Белимов А. А., Гоголев Ю. В. Пути метаболизма фитогормона абсцизовой кислоты ризосферными бактериями	323

Юрков А. П., Крюков А. А., Горбунова А. О., Кудряшова Т. Р., Ковальчук А. И., Горенкова А. И. Биоразнообразие грибов арбускулярной микоризы в долинах рек, лесах и субальпийских лугах Северного Кавказа	325
Яруллина Л. Г., Калацкая Ж. Н., Цветков В. О., Бурханова Г. Ф., Еловская Н. А., Рыбинская Е. И., Заикина Е. А., Черепанова Е. А., Гилевская К. С., Николайчук В. В. Бактерии рода <i>Bacillus</i> в комплексе с нанокompозитами хитозана как стимуляторы устойчивости растений широкого спектра действия	327

III Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания»

Секция 4.1. Механизмы адаптации микроорганизмов к факторам внешней среды

Ананьина Л. Н., Алеев В. С., Шестакова Е. А., Горбунов А. А. Скрининг галофильных и галотолерантных бактерий, выделенных из почвы северного района Пермского края, на способность к росту при низкой температуре	330
Андронов Е. Е., Семенов М. В., Кичко А. А., Курчак Н., Проворов Н. А. Пути сокращения метагеномики для практических приложений в исследованиях окружающей среды	332
Ахова А. В., Ткаченко А. Г. Изменение энергетических параметров бактериальных клеток в условиях стресса	333
Банзаракцаева Т. Г., Бархутова Д. Д. Экологические условия и таксономическое разнообразие микробных сообществ воды холодных источников Забайкалья	335
Бархутова Д. Д., Зайцева С. В., Данилова Е. В., Лаврентьева Е. В., Раднагуруева А. А., Дагурова О. П. Реакция микробного сообщества горячих источников Байкальского региона на изменение окружающей среды	337
Бетехтина А. А., Некрасова О. А., Малахеева А. В., Воропаева О. В., Малева М. Г. Ризосферная микрофлора злаков и двудольных трав, колонизирующих зооотвалы	340
Галиева Г. Ш., Данилова Н. В., Курынцева П. А., Галицкая П. Ю., Селивановская С. Ю. Влияние субстрата выращивания и нового удобрения на растительный микробиом и урожайность растений салата <i>Lactuca sativa</i>	342
Глушень Е. М., Ровенская И. А. Адаптивная селекция микроорганизмов-деструкторов к биотическим и абиотическим факторам как основа создания эффективных биопрепаратов для охраны окружающей среды	344

Граскова И. А., Романова И. М., Мориц А. С., Перфильева А. И. Влияние нанокомпозитов селена на дыхание бактериальной клетки <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> , вызывающей кольцевую гниль картофеля	346
Дагурова О. П., Замбалаев А. В., Раднагуруева А. А. Динамика роста и протеолитической активности бактерий, изолированных из реки Селенги, при разных температурах культивирования	348
Дятлова Ю. А., Тугарова А. В., Кенжегулов О. А., Камнев А. А. Мониторинг макромолекулярного состава сухой биомассы бактерий в разных физиологических состояниях методом инфракрасной Фурье-спектроскопии	350
Каракотов С. Д., Желтова Е. В., Божко К. Н., Балаева Н. А., Алейник И. А., Вильданова Г. И. Разложение имазамокса в присутствии специального микробиологического удобрения «Биокомпозит-Деструкт»	352
Кашеварова Н. М., Мендограло Е. Ю., Нестерова Л. Ю., Ткаченко А. Г. Поиск перспективных антибактериальных соединений в ряду индоллилбензимидазольных производных, обладающих ингибирующей активностью в отношении алармонсинтетаз	354
Козырева Л. П., Зайцева С. В., Дагурова О. П., Дамбаев В. Б. Адаптация микробных сообществ мерзлотных почв (Еравнинская котловина, Бурятия) к изменению условий среды обитания	357
Кондратьева Л. М., Андреева Д. В., Литвиненко З. Н., Голубева Е. М. Адаптация микроорганизмов к замерзанию/оттаиванию в зоне влияния зимнего оползня	360
Лаврентьева Е. В. Микробные сообщества соленых озер Баргузинской котловины: экология, таксономическое разнообразие, пептидазная активность	362
Маркова Ю. А., Васильев И. А., Кривенко Д. А., Петрушин И. С., Перерва П. А., Чернышова О. А., Хадеева Е. Р., Рыбьяков Р. Ю., Галивонджян А. Х., Демкина А. О., Гилеп К. А., Сутормин Д. А. Взаимосвязь между физико-химическим составом и микробиом образцов почв, отобранных на западном побережье оз. Байкал и острове Ольхон	365
Матюгина Е. Б., Белькова Н. Л. Адаптационные стратегии микробных сообществ соленых озер (Восточное Забайкалье)	367
Нестеренко Л. Е., Юрченко Е. А., Юрченко А. Н. Вторичные метаболиты морских грибов <i>Penicillium hispanicum</i> , <i>Asteromyces cruciatus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> как способ адаптации к изменению условий внешней среды	369
Плешко Е. М., Журина М. В. Устойчивость к антибиотикам бактерий рода <i>Kocuria</i>	371
Птушенко В. В., Бондаренко Г. Н., Глаголева Е. С., Лобакова Е. С., Птушенко О. С., Соловченко А. Е., Терентьев В. В., Трубицин Б. В., Шибзухова К. А. Белок PsbS как компонент стресс-индуцированной защитной реакции фотосинтетического аппарата у одноклеточной зелёной водоросли <i>Lobosphaera incisa</i>	374

Пусенкова Л. И., Гарипова С. Р., Ласточкина О. В. Оснащение оздоровленных клубней эндофитными бактериями <i>Bacillus subtilis</i> как биологический метод пролонгированного управления урожайностью, адаптивным потенциалом и качеством картофеля	376
Романова И. М., Мориц А. С., Граскова И. А. Влияние наноконпозитов селена и арабиногалактана на жирнокислотный состав бактерии <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp <i>sepidonicum</i> , вызывающей кольцевую гниль картофеля	379
Терёшина В. М., Януцевич Е. А., Данилова О. А., Кочкина Г. А., Бондаренко С. А., Биланенко Е. Н., Георгиева М. Л., Грум-Гржимайло О. А. Адаптация экстремофильных микромицетов к абиотическим факторам	381
Тугарова А. В., Владимирова А. А., Камнев А. А. Трансформация соединений селена на примере бактерий рода <i>Azospirillum</i>	383
Тупикова Г. С., Егорова И. Н., Шергина О. В. Первые сведения о пигментном составе <i>Nostoc commune</i> из антропогенно-нарушенных территорий Предбайкалья	386
Худокормов А. А., Самков А. А., Волченко Н. Н., Монсева Е. В., Круглова М. Н., Карасёва Э. В. Изменение нефтеокисляющей активности аборигенных бактерий при внесении в почву лёгкой пластовой нефти	387
Цыренова Д. Д., Данилова Э. В., Бархутова Д. Д. Выявление оптимального источника азота для роста и развития <i>Nodularia</i> sp.	390
Юрченко Е. А., Юрченко А. Н. Роль вторичных метаболитов в адаптации морских грибов к условиям обитания и перспективы их практического применения	392

Секция 4.2. Адаптация микроорганизмов к условиям обитания в организме хозяина (животное, человек)

Белькова Н. Л. Типирование кишечной микробиоты человека	393
Борисова С. В., Волох О. А. Использование современных методов для оценки устойчивости <i>Francisella tularensis</i> к стресс-факторам	396
Клименко Е. С., Белькова Н. Л., Погодина А. В., Даренская М. А., Рычкова Л. В. Варианты кишечного микробиоценоза у подростков с ожирением	398
Михайловская В. С., Starčič Erjavec M., Кузнецова М. В. Сельскохозяйственные животные – источник мультирезистентных штаммов <i>Escherichia coli</i> с высоким трансмиссивным потенциалом	400
Огарков О. Б., Синьков В. В., Орлова Е. А., Суздальницкий А. Е., Кондратов И. Г., Белькова Н. Л. Анаэробные микроорганизмы туберкулезного очага	403
Похиленко В. Д., Дунайцев И. А., Батаева Ю. В., Текутов А. Р. Колонизационная резистентность пробиотических бактерий	405

Самсонова А. П. Взаимосвязь между гостальной специфичностью лептоспир различных серологических групп и различиями в этиологической структуре лептоспирозов людей на территории СССР/России в отдельные временные отрезки с 1962 по 2022 г.	406
--	-----

Секция 4.3. Биопленкообразование как одна из форм адаптации микроорганизмов

Волкова Л. В., Безматерных И. С., Волков А. Г., Кононова Л. И. Ингибирующая активность лейкоцитарного пептидного комплекса на биопленкообразование микроорганизмов	410
Евстигнеева С. С., Чумаков Д. С., Гулий О. И. Бактериальные биопленки и современные методы их обнаружения на различных субстратах	412
Каракозова М. В., Назаров П. А. Комплексный анализ антибактериального и антибиопленочного действия веществ растительного происхождения	415
Каюмов А. Р. Особенности восприимчивости бактерий к антибиотикам в смешанных сообществах	416
Лобанова А. Н., Полюдова Т. В. Биопленки <i>Mycolicibacterium smegmatis</i> на поверхности полистирола и их чувствительность к антимикробным пептидам	418
Максимова Ю. Г., Пьянкова Е. В., Максимов А. Ю. Влияние углеродных наноматериалов на биопленкообразование микроорганизмов и их адаптационные реакции	420
Максимова Л. А., Шафикова Т. Н., Еникеев А. Г., Семенов А. А. Монофталааты как фактор регуляции биопленкообразования	423
Немченко У. М., Белькова Н. Л., Зугеева Р. Е., Савилов Е. Д. Влияние тобрамицина на биопленкообразование штаммов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , выделенных у больных муковисцидозом	425
Нестерова Л. Ю., Гельцер Д. В., Ткаченко А. Г. Влияние биогенных полиаминов на межклеточные взаимодействия бактерий	428
Орлова Е. А., Кондратов И. Г., Шварц Я. Ш., Немкова Е. К., Огарков О. Б. Образование биоплёнки при совместном культивировании <i>Mycobacterium bovis</i> var. BCG и <i>Corynebacterium kefirresidentii</i> из туберкулёзного очага	430
Самойлова З. Ю., Смирнова Г. В., Октябрьский О. Н. Влияние фенольных соединений на биопленкообразование бактерий <i>Escherichia coli</i> , мутантных по тиоловым системам	433
Сыровацкая Г. А., Максимова Ю. Г. Биопленкообразование нитрилгидролизующих бактерий высокоминерализованной экстремальной среды антропогенного происхождения	435
Авторский указатель	439

**IV МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«РАСТЕНИЯ И МИКРООРГАНИЗМЫ:
БИОТЕХНОЛОГИЯ БУДУЩЕГО»**

**Секция 1
ГЕНЕТИКА, ФИЗИОЛОГИЯ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

**РОЛЬ СОВМЕСТНОГО ДЕЙСТВИЯ ФИТОГОРМОНОВ
АБСЦИЗОВОЙ И ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТ
ПРИ ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ И АДАПТАЦИИ
К СТРЕССУ**

Л. И. Арабова, Л. В. Чумикина, А. Ф. Топунов

Институт биохимии им. А. Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН, Москва, l.arabova@gmail.com

К ключевым аспектам роста растений относятся развитие семян, прорастание, а также выживание растений в неблагоприятных условиях окружающей среды. Развитие и рост растений находятся под постоянным контролем различных фитогормонов, которые находятся в тесном взаимодействии друг с другом. Двумя важными фитогормонами являются абсцизовая кислота (АБК, гормон покоя) и индолил-3-уксусная кислота (ИУК, гормон роста). АБК тормозит ростовые и метаболические процессы, способствует формированию семян и их покою, а также выполняет важную роль в устойчивости к абиотическому стрессу. ИУК – ауксин, относится к веществам индольной природы, выполняет ключевую роль в развитии растений и необходим для роста молодых проростков [Кулаева, 2004]. Ранние этапы прорастания семян – это переход из состояния покоя к активному метаболизму. Чтобы прорасти, семена должны противостоять различным экологическим стрессам, в том числе и высоким температурам. Известно, что в сухом семени содержится все необходимое для прорастания семян. Особенно важно было исследовать уровень фитогормонов в зародыше, поскольку именно в нем происходит остановка и возобновление роста. В своей работе мы установили взаимосвязь между эндогенными уровнями ИУК и АБК на ранних стадиях прорастания (0–48 ч)

семян пшеницы при нормальной (22 °С) и повышенной (40 °С) температурах. Содержание фитогормонов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [Кислин, 2004]. Показано, что в сухих зародышах присутствует АБК и ИУК как в свободной, так и конъюгированной формах, но преобладали конъюгаты (рис. 1, табл. 1).

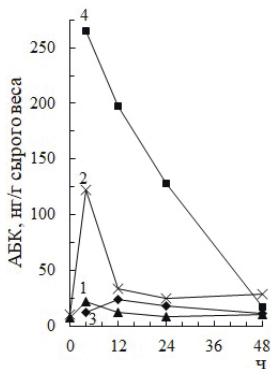


Таблица 1
Изменение содержания свободной и связанной форм ИУК в зародышах пшеницы во время набухания при 22° и 40 °С

Время набух., ч	ИУК своб., нг/г сыр. веса		ИУК связ., нг/г сыр. веса	
	22 °С	40 °С	22 °С	40 °С
0	23±1	—	2134±107	-
4	103±5	680±34	5343±267	7168±358
12	150±8	670±33	205±10	2124±106
24	240±12	724±36	933±47	1976±99
48	418±21	100±5	1463±73	706±35

Рис. 1. Изменение содержания свободной (1 и 3) и связанной форм (2 и 4) АБК в зародышах, набухавших при 22 °С и 4 ч при 40 °С

В процессе набухания семян общее содержание ИУК немного увеличивалось к началу роста проростка, и при этом возобновлялись все метаболические процессы, подготавливающие прорастание, и происходило проклевывание семян (рис. 2, а).

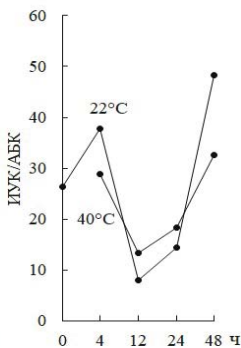
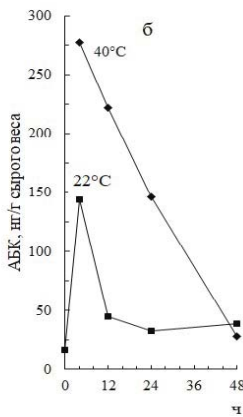
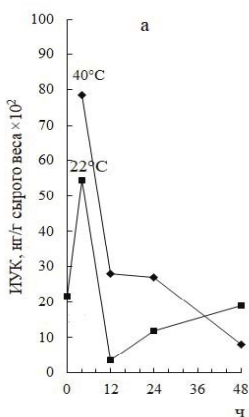


Рис. 2. Изменение общего содержания ИУК (а) **Рис. 3.** Соотношение ИУК к АБК АБК (б) в зародышах пшеницы

Увеличение уровня свободной ИУК сопровождалось снижением уровня связанной кислоты, что могло быть результатом высвобождения ИУК из конъюгированной формы или усилением биосинтеза этого гормона на протяжении всего периода до проклевывания (табл. 1). Несмотря на то что характер изменения общего содержания АБК (рис. 2, б) был сходен с динамикой ИУК (рис. 2, а), было установлено, что при 22 °С в самом начале набухания семян изменение уровня связанной АБК идет параллельно увеличению свободной ее формы (рис. 1). Следовательно, изменение уровня АБК происходит не за счет реакции в системе свободная-связанная форма, а осуществлялось за счет синтеза фитогормона *de novo*. Во время своего развития растения поддерживают баланс между уровнями АБК и ИУК как при нормальных, так и стрессовых условиях окружающей среды, характерной особенностью которого является высокая чувствительность к внешним воздействиям. Благодаря этому происходит переключение клеток с программ нормального развития на адаптивные. Как видно из рис. 3, соотношение ИУК к АБК после небольшого падения практически не менялось до точки роста, а в точке роста возрастало. Это означает, что колебания соотношения связаны с накоплением фитогормонов или их переходом из неактивного состояния в активное и обратно. А резкое повышение температуры индуцировало быстрые изменения в гормональной системе (см. рис. 2). При коротком тепловом шоке (4 ч 40 °С) происходило увеличение содержания как АБК, так и ИУК, при этом соотношение этих гормонов поддерживалось на уровне, близком к уровню при нормальной температуре (см. рис. 3). Вероятно, это способствует тому, что семена могут преодолеть непродолжительный тепловой стресс. Обнаружена зависимость ростовых процессов от соотношения ИУК/АБК при коротком тепловом шоке. Показано, что процессы, связанные с проклевыванием, более термочувствительны по сравнению с процессами в фазах физического набухания и роста проростка. Таким образом, нами установлена взаимосвязь ИУК и АБК и определены конкретные временные точки взаимодействия этих гормонов на ранних стадиях развития пшеницы при нормальной и повышенной температурах. Изучение влияния теплового стресса на различные регуляторные системы раннего прорастания семян необходимо для понимания механизмов адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Литература

- Кислин Е. Н. Определение природных фитогормонов с помощью хроматографических методов. СПб. : Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. С. 8–9.
- Кулаева О. Н., Прокопцева О. С. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов. Обзор // Биохимия. 2004. Т. 69, № 3. С. 293–310.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ЛЮЦЕРНЫ (*MEDICAGO TRUNCATULA*) С ПОТЕРЕЙ ФУНКЦИИ ГЕНА *MTWOX2*

А. М. Артемюк, В. Е Творогова, Л. А Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург,
nastyart2004@gmail.com, krubaza@mail.ru, la.lutova@gmail.com

WOX2 – транскрипционный фактор растений из семейства *WOX* (*WUSCHEL*-related homeobox), гены которого отвечают за регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток. У *Arabidopsis thaliana* *WOX2* экспрессируется во время эмбриогенеза, где он регулирует деление клеток [Differential expression ... , 2008], а его ортологи у некоторых видов растений – на ранних стадиях формирования соматических эмбрионов (эмбрионов, формирующихся при культивировании *in vitro* из соматических тканей).

Получение соматических эмбрионов широко используется в биотехнологии для размножения растений и их трансформации, однако для некоторых сортов и видов условия индукции соматического эмбриогенеза (СЭ) не найдены, поэтому поиск и изучение возможных регуляторов СЭ является важной задачей для биотехнологии.

Для *Medicago truncatula* (люцерна усечённая) было показано, что сверхэкспрессия *MtWOX2* не влияет на количество соматических эмбрионов у эксплантов, однако влияет на каллусообразование; кроме того, изменения транскриптома каллуса при сверхэкспрессии *MtWOX2* во многом противоположны изменениям, связанным со сверхэкспрессией *MtWOX9-1*, стимулятора СЭ [*MtWOX2* and *MtWOX9-1* ... , 2023].

Для дальнейшего изучения влияния *MtWOX2* на СЭ у люцерны мы получаем линию с потерей функции этого гена, с использованием технологии геномного редактирования на основе CRISPR/Cas.

В настоящий момент получены растения-гетерозиготы поколения T1.

Кроме того, для упрощения оценки влияния различных генов на СЭ и получения трансгенных растений у *M. truncatula* мы разрабатываем систему культивации эксплантов в жидкой среде для трансформации и образования соматических эмбрионов. В то время как твёрдая среда используется чаще, применение жидкой среды имеет ряд преимуществ: позволяет использовать в качестве эксплантов фрагменты черешков вместо листьев, упрощает процесс замены питательной среды и делает возможным использование многоразовых контейнеров для культивирования.

К настоящему времени мы оценили возможность использования гитромицина и цефотаксима в такой среде для селекции трансгенных клеток растений и для элиминации агробактерий, соответственно.

Литература

Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo / H. Breuninger, E. Rikirsch, M. Hermann [et al.] // *Developmental cell*. 2008. Vol. 14, N 6. P. 867–876. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.03.008

MtWOX2 and *MtWOX9-1* Effects on the Embryogenic Callus Transcriptome. *Medicago truncatula* / E. Y. Krasnoperova, V. E. Tvorogova, K. V. Smirnov [et al.] // *Plants* (Basel). 2023. 28 Dec. Vol. 13, N 1. Art. 102. DOI: 10.3390/plants13010102

СОЗДАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ CRISPR/CAS РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА *1-FEH* *CICHORIUM INTYBUS* L.

Э. А. Баймухаметова¹, Х. Г. Мусин¹, Д. Ю. Швеиц^{1,2}, Б. Р. Кулуев¹

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, elvina.baimuhametova@yandex.ru

²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Cichorium intybus является одним из важнейших коммерческих источников инулина. Инулин – полисахарид, состоящий из остатков фруктозы в форме фуранозы, являющийся перспективным компонентом функционального питания и широко используемый в качестве источника пищевых волокон. В цикории средняя длина цепи инулина варьирует в зависимости от сезона. В конце вегетационного периода инулин гидролизуются, что помогает растению противостоят зимним холодам и приводит к увеличению содержания свободных сахаров (сахарозы, глюкозы и фруктозы). Считается, что уменьшение средней длины цепи инулина и параллельное увеличение количества свободных сахаров происходит в результате снижения экспрессии гена *1-SST* (1-sucrose: sucrose fructosyltransferase) и параллельном повышении уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты, гидролизующие инулин (van Arkel et al., 2012), а именно *1-FEH* (fructan 1-*exohydrolase*). Таким образом, можно предположить, что нокаут гена *1-FEH* цикория методом CRISPR/Cas может привести к снижению деградации инулина в корнях *C. intybus*, происходящего под воздействием данного фермента.

Для создания генно-инженерной конструкции для CRISPR/Cas редактирования последовательность гена *1-FEH* была взята из GenBank (AJ242538.1). Далее последовательность ДНК этого гена загружали в программу для подбора гидовых РНК «CRISPOR». Входная последовательность имела длину 1870 п. н. и содержала 190 возможных гидовых последовательностей. Далее полученные последовательности проверяли на сайте RNAfold Webserver для того, чтобы выяснить будет ли иметь полученная с помощью данной гидовой последовательности РНК нормальную структуру. Структура гидовой РНК должна иметь двушпильчатую форму, иначе взаимодействие с белком Cas будет затруднена. Далее проверяли места нецелевого прикрепления гидовых последовательностей в базе данных Ensembl, чтобы избежать off-target редактирования. В итоге было подобрано 5 последовательностей гидовой РНК для образования делеции в гене *1-FEH* цикория. Сборку гидовых РНК осуществляли в модульную генетическую конструкцию pTRANS_230 с помощью реакции Golden Gate. Полученную конструкцию клонировали в бактерии *Escherichia coli* штамма XL1-blue и с помощью ПЦР-анализа проверяли правильность сборки конструкции и отбирали подходящие колонии. Целевую генетическую конструкцию далее методом электропорации встраивали в клетки бактерий *Agrobacterium tumefaciens* штаммов EHA105 и AGL0 для дальнейшего использования их для трансформации цикория и нокаута гена *1-FEH*.

ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КАЛЛУСНОЙ И СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРАХ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L.

Е. В. Березина, М. В. Ларина, Г. А. Волынец, А. А. Сёмин,
А. А. Брилкина

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, berezina.kat@gmail.com

Представители семейства Ericaceae, в частности, голубика щитковая (*Vaccinium corymbosum* L.), характеризуются значительным накоплением фенольных соединений [Особенности накопления ... , 2014; Yavorska, Vorobets, Vishchur, 2021]. Растительные фенольные соединения (особенно катехины и проантоцианидины) обладают высокой биологической активностью, однако их биосинтез ограничен сезонностью развития растений. В связи с этим для круглогодичного получения фенольных соединений можно использовать каллусные и суспензионные культуры.

Для растительных клеточных культур, не имеющих хлорофилла и не способных к автотрофному питанию, необходимым компонентом питательных сред являются углеводы. Клеточные культуры могут расти на средах с различными углеводами, и в биотехнологии растений в качестве источника углерода чаще всего используют сахарозу, глюкозу и фруктозу. Поступление в клетку углеводов может способствовать индукции генов фенольного биосинтеза, например, генов халконсинтазы и дигидрофлавонолредуктазы [Sucrose-specific induction ... , 2006], и, как следствие, накоплению фенольных соединений в клетке [Long-term *in vitro* ... , 2014]. Изменение концентрации и состава углеводов в питательных средах делает возможным не только увеличение в клетках суммарного содержания фенольных соединений, но и изменение их состава в сторону накопления определенных веществ.

Целью работы было оценить влияние углеводного состава питательной среды на содержание фенольных соединений в каллусной и суспензионной культурах *V. corymbosum*.

Каллусы инициировали из ягод *V. corymbosum*, суспензионные клетки – из полученных каллусов. Культивирование осуществляли на свету на твердой и жидкой питательной среде Woody Plant Medium (WPM) с гормонами 2,4-Д и БАП (по 0,5 мг/л) и с 30 г/л сахарозы (стандартная среда). Для выявления влияния углеводов каллусные и суспензионные культуры пересаживали на питательные среды с сахарозой, глюкозой или фруктозой в концентрации 30, 50 или 70 г/л. Контролем служила стандартная среда WPM. По окончании пассажа растительный материал фиксировали кипящим 80 % раствором этанола и в полученных экстрактах фотометрически определяли содержание растворимых фенольных соединений (РФС), катехинов [Запрометов, 1971] и проантоцианидинов [Хишова, Бузук, 2006].

В ходе работы выявили, что суспензионная культура *V. corymbosum* накапливает фенольные соединения в два-три раза больше, чем каллусная культура. Наиболее интенсивно эти культуры накапливают фенольные соединения в присутствии в среде 50–70 г/л углеводов: содержание РФС достигает 8–9 и 14–16 мг/г сырой массы, катехинов – 4–5 и 9–13 мг/г сырой массы (значения приведены для каллусных и суспензионных культур соответственно). Это в 1,3–3 раза больше, чем в контроле. Содержание проантоцианидинов у суспензионных культур в присутствии в среде 50–70 г/л углеводов также больше, чем в контроле, а у каллусных культур оно от контроля не отличается. Вероятно, повышенное накопление фенольных соединений в объектах исследования при увеличении концентрации углеводов в среде связано с тем, что углеводы являются, с одной стороны, сигнальными молекулами, регулируемыми экспрессию генов фенольного биосинтеза, а с другой стороны, – субстратами для биосинтеза фенольных соединений. Причиной же более низкого содержания фенольных соединений у каллусной, чем у суспензионной, культуры и меньшей (в случае проантоцианидинов) отзывчивости каллусной культуры на изменение углеводного состава питательной среды является неравномерная доступность компонентов среды для всех клеток каллуса.

Таким образом, на содержание фенольных соединений у каллусной и суспензионной культур *V. corymbosum* влияет концентрация углевода, но не его природа. С увеличением концентрации углевода в питательной среде у каллусной и суспензионной культур увеличивается содержание РФС и катехинов; у суспензионной культуры – также проантоцианидинов. Результаты работы могут быть использованы при оптимизации условий культивирования растительных клеток *in vitro* для получения ценных вторичных метаболитов.

Литература

- Запрометов М. Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 185–197.
- Особенности накопления фенольных соединений в листьях и ягодах некоторых представителей рода *Vaccinium* из коллекции НИИ Ботанический сад Нижегородского государственного университета / А. А. Брилкина, М. Н. Агеева, Е. В. Березина [и др.] // Вестник Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского. Н. Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского. 2014. № 3, ч. 3. С. 30–34.
- Шишова О. М., Бузук Г. Н. Количественное определение процианидинов плодов боярышника // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40, № 2. С. 20–21.
- Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation / Z. W. Dai, M. Meddar, C. Renaud [et al.] // Journal of experimental botany. 2014. Vol. 65, N 16. P. 4665–4677.
- Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis / C. Solfanelli, A. Poggi, E. Loreti [et al.] // Plant physiology. 2006. N 140. P. 637–646.
- Yavorska N., Vorobets N., Vishchur O. Arbutin content in *Vaccinium corymbosum* L. shoots during stages of phenological development // Polish journal of science. 2021. N 36–1 (36). P. 25–28.

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ НА ОБРАЗОВАНИЕ СУПЕРОКСИД-АНИОНА ЭТИОЛИРОВАННЫМИ И НЕЭТИОЛИРОВАННЫМИ РАСТЕНИЯМИ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ

О. В. Бледных, Н. А. Роденко, В. А. Глушечков, Ю. В. Дегтева

Самарский федеральный исследовательский центр РАН
Самара, helgv@blednykh.ru

В настоящее время накоплен большой объем данных посвящённых воздействию на растения постоянных, переменных и импульсных магнитных полей (ИМП) низкой напряжённости $H < 0,08 \cdot 10^6$ А/м или индукции $B < 0,1$ Тл [Massimo, 2014]. Особенно выделяются результаты исследований по воздействию магнитного поля на механизмы генерации активных форм кислорода [Пономарев, Новиков, 2009], на активность антиоксидантных ферментов [Сердюков, Новицкий, 2013], на перекисное окисление липидов [Изменение уровня ... , 2011], на окислительное повреждение нуклеиновых кислот [Текуцкая, Барышев, 2020], а также на резонансные явления, происходящие в важных ионах: Ca^{+2} , K^+ , Mg^{+2} , Na^+ и др. [Walleczek, Budinger, 1992]. Воздействие импульсного магнитного поля высокой напряжённости (индукции) с временем воздействия на растения от 2 до 5 мсек практически не изучено.

Целью работы являлось – изучить воздействие импульсного магнитного поля высокой напряжённости (индукции) на механизм образования активных форм кислорода в виде генерации супероксид-аниона неэтиолированными (зелёными) и этиолированными растениями пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). Эксперимент проводился на экспериментальной установке МИО-БИО-5, разработанной научным коллективом лаборатории «Биоинженерия» Самарского федерального исследовательского центра Российской академии наук, с использованием специально сконструированного многовиткового цилиндрического индуктора для воздействия на биообъекты в пробирках объёмом 25 мл. Объектами исследования являлись девятисуточные зелёные и этиолированные ростки пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L., полученные в лабораторных условиях. Биохимические исследования проводились методом фотометрического анализа экстрактов растений на спектрофотометре Альтаир КФК-300УФ (Россия) при 480 нм после проведённой реакции окисления адреналина до адrenoхрома [Сахабутдинова, Фатхудинова, Шакирова, 2004].

При осуществлении анализа были получены следующие результаты уровня генерации супероксид-аниона неэтиолированными (зелёными) и этиолированными растениями через 60 мин после воздействия импульсным магнитным полем высокой напряжённости (ИМП) с индукциями $B = 0,53$ Тл, $B = 2,21$ Тл, $B = 3,71$ Тл и $B = 5,21$ Тл (рис.)

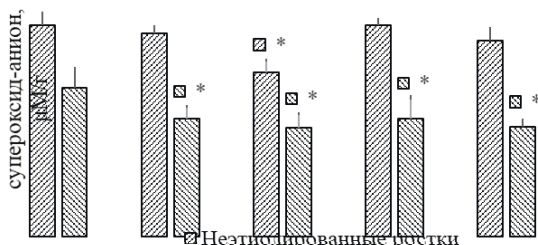


Рис. Уровни генерации супероксид-аниона неэтиолированными (зелёными) и этиолированными ростками *Triticum aestivum* L. через 60 мин после воздействия ИМП
Примечание: * – отличие уровней генерации супероксид-аниона от контрольных значений достоверны с уровнем значимости $p < 0,05$

Анализируя представленные данные на рис. 1 видно, что уровень генерации супероксид-аниона неэтиолированными ростками при значениях индукций $B = 0,53$ Тл, $B = 3,71$ Тл и $B = 5,21$ Тл равны контрольному значению ($2,17 \pm 0,14$ µM/г), а при индукции $B = 2,21$ Тл снижается в 1,3 раза ($1,69 \pm 0,14$ µM/г), а уровень генерации этиолированными ростками ниже контрольного ($1,53 \pm 0,21$ µM/г) в 1,3 раза при индукциях $B = 0,53$ Тл ($1,21 \pm 0,14$ µM/г) и $B = 3,71$ Тл ($1,21 \pm 0,24$ µM/г) и в 1,4 раза при индукциях $B = 2,21$ Тл ($1,12 \pm 0,16$ µM/г) и $B = 5,21$ Тл ($1,13 \pm 0,08$ µM/г).

Таким образом установлено, что уровень генерации супероксид-аниона после воздействия ИМП неэтиолированными (зелёными) ростками выше, чем уровень генерации этиолированными растениями в 2 раза при значениях индукций $B = 0,53$ Тл и $B = 3,71$ Тл, в 1,5 раза при индукции $B = 2,21$ Тл и в 1,7 раза при индукции $B = 5,21$ Тл.

Выдвинуто предположение, что снижение уровня генерации супероксид-аниона через 60 мин после воздействия ИМП связано с усилением спонтанного превращения в пероксид водорода и увеличением активности супероксиддисмутазы (СОД), что требует проведения дополнительных исследований.

Литература

Изменение уровня перекисного окисления липидов и активность компонентов антиоксидантного комплекса в хлоропластах гороха при воздействии слабых импульсных магнитных полей / Е. О. Половинкина, Е. А. Касьянова, Ю. В. Сеницына, А. П. Веселов // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 930–934.

Пономарев В. О., Новиков В. В. Влияние низкочастотных переменных магнитных полей на скорость биохимических реакций, протекающих с образованием активных форм кислорода // Биофизика. 2009. Т. 54, № 2. С. 235–241.

Сахабутдинова А. Р., Фатхудинова Д. Р., Шакирова Ф. М. Влияние салициловой кислоты на активность антиоксидантных ферментов у пшеницы в условиях засоления // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 5. С. 579–583.

Сердюков Ю. А., Новицкий Ю. И. Действие слабого постоянного магнитного поля на активность антиоксидантных ферментов у проростков редиса // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 1. С. 66–74.

Текуцкая Е. Е., Барышев М. Г. Окислительные повреждения ДНК, ионизирующие излучения и магнитные поля // Актуальная биотехнология. 2020. № 3. С. 518–521.

Massimo E. M. Magnetic field effects on plant growth, development, and evolution // Frontiers in Plant Science. 2014. Vol. 5. P. 1–15.

Walleczek J., Budinger T. F. Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity // FEBS Letters. 1992. Vol. 314, N 3. P. 351–355.

ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У ТОПОЛЕЙ СЕКЦИЙ *AIGEIROS DUBY* И *TACAMAHACA SPACH*

**Е. В. Борхерт¹, Е. Н. Пушкова¹, Я. В. Бодров^{1,2}, А. С. Мазина^{1,2},
Т. Ю. Рыбакова^{1,3}, Н. В. Мельникова¹, А. А. Дмитриев¹**

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН
Москва, sashai@inbox.ru

²Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова
ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва

³Российский государственный аграрный университет –
МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва

Тополь (*Populus*) – одно из самых обсуждаемых деревьев, используемых в озеленении. С одной стороны, его неприхотливость, высокая скорость роста и большая листовая поверхность, выделяющая много кислорода, делает его незаменимым растением для городов средней полосы России, где в основном используются виды и гибриды секций *Aigeiros Duby* и *Tacamahaca Spach*. С другой стороны, пух (опушенные семена) ежегодно наносят ущерб жителям и коммунальным службам. Растения тополя разделяются по полу на мужские и женские, и пух образуют только женские деревья, поэтому решением проблемы является выращивание только не образующих пуха мужских генотипов. За последние несколько лет совершен прорыв в молекулярно-генетических исследованиях пола у рода *Populus*: идентифицирован половой локус, определена его нуклеотидная последовательность, найдены специфичные для мужских и женских растений ДНК-полиморфизмы, установлен молекулярно-генетический механизм детерминации пола [A single gene ... , 2020; Evidences for a role ... , 2020; Sequencing and Analysis ... , 2020; Genome Assembly ... , 2021; Geraldès et al., 2015]. Благодаря этому стала возможна разработка ДНК-тест-систем для определения пола тополя и выбора для озеленения только мужских, не образующих пуха, растений.

Ранее нами выявлена полоспецифичная экспрессия гена *CLC* (*Chloride channel protein CLC-c*) у тополя сибирского [Genome and Transcriptome ... , 2021]. Полученные данные и дополнительный анализ геномных сборок других видов секций *Aigeiros* и *Tacamahaca* позволили идентифицировать короткую инсерцию в гене *CLC*, присутствующую в Y хромосомах, но отсутствующую в X хромосомах. Для идентификации

этой инсерции разработан подход, основанный на CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences)-анализе, который заключается в амплификации участка генома, содержащего сайт с искомой инсерцией, проведении рестрикции ПЦР-продуктов и визуализации продуктов рестрикции методом электрофореза в агарозном геле.

ПЦР проводили на амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, США) в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 2 единицы полимеразы HS (Евроген, Россия), однократный буфер Turbo для полимеразы HS (Евроген), 300 нМ каждого праймера (Евроген), 250 мкМ dNTP (Евроген) и 6 нг ДНК. Использовали следующую программу ампликации: 95 °С – 3 мин; 40 циклов: 95 °С – 15 с, 58 °С – 30 с и 72 °С – 30 с; 72 °С – 3 мин. Далее проводили рестрикцию ПЦР-продуктов. Подобрана эндонуклеаза рестрикции, имеющая сайт узнавания, который присутствует только в Y хромосомах. Рестрикцию проводили на амплификаторе MiniAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 10 единиц эндонуклеазы рестрикции, однократный SE-буфер B для рестрикции, 100 мкг/мл BSA и 8 мкл ПЦР-продукта. Использовали следующую программу: 4 ч – 37 °С; 20 мин – 65 °С. Для анализа результатов рестрикции проводили электрофорез в 2 % агарозном геле. Длины фрагментов составляли 293 п. н., 109 п. н. и 184 п. н. для мужского (XY) генотипа (для X хромосомы ампликон не подвергается разрезанию, поэтому остается фрагмент 293 п. н., а для Y хромосомы ампликон разрезается на две части: 109 п. н. и 184 п. н.) и 293 п. н. для женского (XX) генотипа (для X хромосом сайт рестрикции отсутствует, поэтому визуализируется исходный ампликон длиной 293 п. н.).

Проверка эффективности работы созданной тест-системы для определения пола топоя проведена на 96 образцах видов/гибридов секций *Aigeiros* и *Tacamahaca*, для которых на основе морфологии ранее определена принадлежность к мужскому или женскому полу. Для всех мужских генотипов на электрофореграмме визуализировались три фрагмента ДНК длиной 293 п. н., 184 п. н. и 109 п. н., а для женских генотипов – один фрагмент ДНК длиной 293 п. н. Результаты ДНК-анализа полностью соответствовали морфологическим данным о половой принадлежности изученных растений.

Таким образом, разработана тест-система, основанная на CAPS-анализе, позволяющая дифференцировать мужские и женские растения топоя секций *Aigeiros* и *Tacamahaca*. Тест-система позволяет идентифицировать мужские растения, которые не будут образовывать пуха, и только их использовать в озеленении городов. По морфологическим признакам можно отличить мужское дерево топоя от женского лишь во время цветения, т. е. не ранее достижения возраста 5–7 лет, и, кроме того, цветение непродолжительно, а в остальное время отличить мужские растения от женских морфологически крайне сложно. Использование ДНК-тест-

системы позволяет определять пол даже у совсем молодых саженцев, а также проводить проверку полового соответствия маточных растений в питомниках. В результате генетические технологии помогут решить проблему потолиного пуха и эффективно использовать эти обладающие многими преимуществами деревья в озеленении.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20122, <https://rscf.ru/project/24-24-20122/>.

Литература

A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination / N. A. Muller, B. Kersten, A. P. Leite Montalvao [et al.] // Nat Plants. 2020. N 6. P. 630–637.

Evidences for a role of two Y-specific genes in sex determination in *Populus deltoides* / L. Xue, H. Wu, Y. Chen [et al.] // Nat Commun. 2020. Vol. 11, N 1. Art. 5893. DOI: 10.1038/s41467-020-19559-2

Genome and Transcriptome Sequencing of *Populus × sibirica* Identified Sex-Associated Allele-Specific Expression of the CLC Gene / E. N. Pushkova, G. S. Krasnov, V. A. Lakunina [et al.] // Front Genet. 2021. Vol. 12. Art. 676935. DOI: 10.3389/fgene.2021.676935

Genome Assembly and Sex-Determining Region of Male and Female *Populus × sibirica* / N. V. Melnikova, E. N. Pushkova, E. M. Dvorianinova [et al.] // Front Plant Sci. 2021. Vol. 12. Art. 625416. DOI: 10.3389/fpls.2021.625416.

Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (*Populus*) / A. Geraldes, C. A. Hefer, A. Capron [et al.] // Mol Ecol. 2015. N 24. P. 3243–3256.

Sequencing and Analysis of the Sex Determination Region of *Populus trichocarpa* / R. Zhou, D. Macaya-Sanz, J. Schmutz [et al.] // Genes (Basel). 2020. Vol. 11, N 8. Art. 843. DOI: 10.3390/genes11080843

РОЛЬ ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *FUS3* В НАКОПЛЕНИИ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ СЕМЯН У ГОРОХА

К. П. Гайнуллина^{1,2}, Е. А. Заикина¹, Б. Р. Кулуев¹

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, evisheva@yandex.ru

²Опытная станция «Уфимская» УФИЦ РАН, Уфа, karina28021985@yandex.ru

Горох – основная зернобобовая культура в нашей стране, которая возделывается на продовольственные, зернофуражные и кормовые цели [Гайнуллина, Кулуев, Давлетов, 2022]. Основным показателем качества зерна гороха является содержание белка, которое у сортов и линий этой культуры из коллекции мировых генетических ресурсов ВИР колеблется от 18,6 до 35,7 % [Вишнякова, 2005]. Известно, что интенсивное накопление запасных питательных веществ в семенах гороха в процессе их созревания регулируется транскрипционными факторами *FUS3*, *ABI3*, *LEC1*, *LEC2* [Transcriptomic insights ... , 2020]. Целью нашего исследования стал сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей и уровней экспрессии гена транскрипционного фактора *FUS3* у сортообразцов гороха, контрастно различающихся по содержанию белка в семенах.

Опыты проводились в 2023 г. Материалом для исследования послужили 50 сортов и линий гороха посевного различного эколого-географического происхождения из коллекции ВИР, которые выращивались на опытном участке УФИЦ РАН в г. Уфе. Концентрацию белка в семенах определяли по методу Брэдфорда на планшетном спектрофотометре LS 55 Luminescence Spectrometer (PerkinElmer, США) в трехкратной повторности. Праймеры подбирали к последовательности нуклеотидов кодирующего участка гена транскрипционного фактора *FUS3*(XM_051055759.1, mRNA) с помощью программы PrimerSelect (DNASar, США). Для выделения мРНК использовали набор ExtractRNA («Евроген», Россия). ПЦР (после конверсии в кДНК) проводили в амплификаторе «Т-100» (Bio-Rad Laboratories, США). Размер ампликона составил 1208 п. н. Секвенирование выполняли по методу Сэнгера с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США) в трех биологических и двух технических повторностях. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей кодирующего участка гена *FUS3* у сортообразцов гороха с высоким и низким содержанием белка в семенах проводили с помощью программы MegAlign (DNASar, США). Количественное определение содержания мРНК (после конверсии в кДНК) гена *FUS3* в семенах гороха на 5, 8 и 12-е сут. после опыления осуществляли методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР были подобраны с помощью программы PrimerSelect (DNASar, США). В качестве стандарта использовали мРНК гена β -тубулина, уровень экспрессии которого принимали за 100 %.

В результате проведенного исследования нами были выделены сортообразцы гороха с наиболее высоким (23,5–26,1 %) содержанием белка в семенах – Аванс, Батрак, Орел-326, Орел-332, Северянин, Степняк, Штамбовый Мальцева, Эффектный, К-6109 (Нидерланды), К-9457 (Тюменская область), К-9524 (Франция), К-10224 (Сирия), и с наиболее низким (18,0–19,7 %) – Фрегат, К-3196 (Турция), К-7503 (США), К-8613 (Великобритания), К-8902 (Нидерланды), К-8972 (Болгария), К-9392 (Австралия), К-9393 (Австралия), К-9479 (Германия), К-9950 (Швеция). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *FUS3* среди групп высокобелковых и низкобелковых сортообразцов позволил выявить несколько нуклеотидных замен и делеций, из которых с накоплением белка в семенах могут быть связаны три однонуклеотидные замены: G/T (669 п. н.), C/T (681 п. н.), C/A (996 п. н.).

Анализ экспрессии гена *FUS3* у высоко- и низкобелковых сортов и линий гороха показал, что на 5-е сут. после опыления относительно высоким уровнем экспрессии характеризовались 5 высокобелковых (Батрак, Орел-332, Штамбовый Мальцева, К-6109 (Нидерланды), К-9524 (Франция)) и 4 низкобелковых (К-8613 (Великобритания), К-8972 (Болгария), К-9950 (Швеция), К-9393 (Австралия)) сортообразца (рис.).

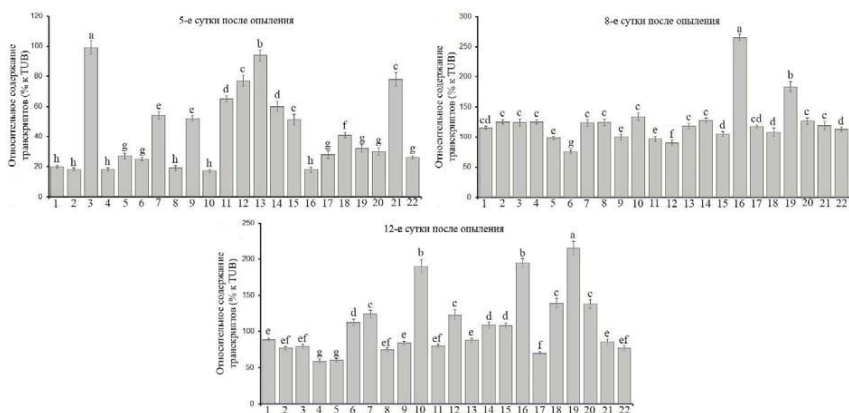


Рис. Результаты анализа экспрессии гена *FUS3* на разных стадиях развития семян у сортообразцов гороха с контрастным содержанием белка в семенах: 1 – Степняк, 2 – К-10224 (Сирия), 3 – Штамбовый Мальцева, 4 – Аванс, 5 – Эффектный, 6 – К-9457 (Тюменская область), 7 – К-9524 (Франция), 8 – Орел-326, 9 – Орел-332, 10 – Северянин, 11 – Батрак, 12 – К-6109 (Нидерланды), 13 – К-8613 (Великобритания), 14 – К-8972 (Болгария), 15 – К-9950 (Швеция), 16 – Фрегат, 17 – К-3196 (Турция), 18 – К-7503 (США), 19 – К-8902 (Нидерланды), 20 – К-9392 (Австралия), 21 – К-9393 (Австралия), 22 – К-9479 (Германия). Буквенные обозначения соответствуют достоверным изменениям показателя по результатам множественного сравнения средних по тесту Дункана ($p \leq 0,05$).

На 8-е сут. после опыления достаточно высоким уровнем экспрессии гена *FUS3* характеризовались сортообразцы Фрегат и К-8902 (Нидерланды) с низким содержанием белка в семенах (см. рис.). На 12-е сут. после опыления относительно высокий уровень экспрессии гена *FUS3* был выявлен у 4 высокобелковых (Северянин, К-6109 (Нидерланды), К-9457 (Тюменская область), К-9524 (Франция)) и 6 низкобелковых (Фрегат, К-750 (США), К-8902 (Нидерланды), К-8972 (Болгария), К-9392 (Австралия), К-9950 (Швеция)) сортообразцов (см. рис.). В целом у всех изученных нами сортов и линий гороха ген *FUS3* экспрессировался на максимальном уровне на 8-е и 12-е сут. после опыления. На ранней стадии развития семян гороха у большинства сортообразцов уровень экспрессии гена *FUS3* был в несколько раз ниже.

Литература

Вишнякова М. А. Коллекция зерновых бобовых культур ВИР как источник исходного материала для актуальных и перспективных направлений селекции // Селекція і насінництво: міжвідомчий тематичний науковий збірник. Харків. 2005. С. 75–83.

Гайнулина К. П., Кулев Б. Р., Давлетов Ф. А. Создание исходного материала для селекции гороха методом химического мутагенеза и оценка его генетического разнообразия с использованием SSR-маркеров // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183, № 3. С. 111–112.

Transcriptomic insights into mechanisms of early seed maturation in the garden pea (*Pisum sativum* L.) / Y. V. Malovichko, O. Y. Shtark, E. N. Vasileva [et al.] // Cells. 2020. Vol. 9, N 3. P. 779–810.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ ПЕРСПЕКТИВНЫХ И МЕСТНЫХ СОРТОВ ОВСА СЕЛЕКЦИИ НИИСХ СЕВЕРНОГО ЗАУРАЛЬЯ

Д. И. Ерёмин А. В. Любимова

ФИЦ Тюменский научный центр СО РАН, НИИСХ СЗ –
филиал ТюмНЦ СО РАН, Тюмень, soil-tyumen@yandex.ru

Одним из последствий глобального потепления на планете является постепенное накопление водорастворимых солей в почве. Это актуально не только для южных регионов, но и для Западной Сибири. Наличие реликтового и современного засоления почв привело к необходимости создания новых сортов овса, обладающих генетической устойчивостью к таким солям как сульфаты, карбонаты и хлориды натрия. Выбор культуры определяется тем, что среди зерновых культур, овёс является самым устойчивым к низкому плодородию почв.

Цель исследований – изучение устойчивости сортов овса местной селекции к возрастающим концентрациям водорастворимых солей натрия, встречающихся на юге Тюменской области.

В качестве объекта исследований были взяты 4 сорта овса: Мегион; Талисман; Отрада и Фома, которые были созданы с учетом почвенно-климатических особенностей Зауралья. В настоящее время 90 % площади, засеваемой овсом занято именно этими сортами. Сортовую реакцию овса на соли различной концентрации изучали в лаборатории геномных исследований в растениеводстве Научно-исследовательского института сельского хозяйства Северного Зауралья методом оценки проростковой солеустойчивости согласно методики ВИР [Семущина, 1980].

За основу был взят метод проращивания семян на дистиллированной воде с параллельным определением энергии прорастания и лабораторной всхожести в солевых растворах NaCl, Na₂CO₃ и Na₂SO₄. Для выявления солевого стресса на ранних этапах онтогенеза использовали следующие концентрации: 1, 3, 5, 7 и 10 г/л.

В ходе проведенных исследований было установлено, что при незначительной концентрации (до 3 г/л) хлорид натрия оказывал достоверное стимулирующее действие на прорастание овса ($p \leq 0,05$). Разница лабораторной всхожести изучаемых сортов между контролем и вариантами с концентрацией 1,0 и 3,0 г/литр составила 3–5 % при НСР05 равном 1,2 %. Аналогичная реакция была и на вариантах с сульфатом натрия. При низких концентрациях карбоната натрия отмечался стресс на этапе прорастания. Наиболее сильно он проявился на сортах Мегион и Талисман – снижение лабораторной всхожести относительно контроля составило 5–8 %. Сорта Отрада и Фома при концентрации карбоната натрия до 3,0 г/литр не показали признаков угнетения.

Повышение концентрации хлорида и сульфата натрия до 5 г/литр обеспечило достоверное снижение всхожести Мегиона и Талисмана на 7–10 %; у сортов Отрада и Фома снижение составило 3–5 % относительно контроля. При повышении концентрации этих солей до 7 г/литр всхожесть уменьшилась на 10–12 %, тогда как у Мегиона и Талисмана – на 30 %. Максимальная концентрация NaCl и Na₂SO₄ в опыте (10 г/литр), соответствующая водной вытяжке солончаковой почве, явилась мощным стрессовым фактором – лабораторная всхожесть изучаемых сортов уменьшилась в половину. Негативный эффект был виден уже на третьи сутки прорастания. Среди изучаемых сортов выделился лишь один сорт Фома, который имел приемлемое снижение всхожести – 37 % относительно контроля.

Наиболее вредоносной в почве солью является карбонат натрия, который существенно подщелачивает почвенный раствор и повышает осмотическое давление. Именно эта соль в Западной Сибири является следствием современного засоления пахотных земель. Поэтому при селекции наиболее важно, что бы новые сорта, обладали высокой резистентностью к ней. Концентрация 5 г/л (имитация посева в засушливую весну на солончаковатых почвах) привела к резкому снижению энергии прорастания и лабораторной всхожести изучаемых сортов. У Мегиона и Талисмана всхожесть уменьшилась с 90 (контроль) до 45 %; Отрады – до 50 % и Фомы – 63 %. Дальнейшее повышение концентрации (до 7 г/л) обеспечило гибель 70–75 % проростков у сортов Мегион, Талисман и Отрада. Всхожесть Фомы достигла 45 %. Создание максимальной концентрации карбоната натрия (10 г/л) привело к практически полной гибели прорастающих семян изучаемых сортов овса. Дисперсионный анализ показал, что лабораторная всхожесть на 15 % зависит от особенностей сорта; на 23 % – от химизма засоления и на 35 % от концентрации солей. Эффект взаимодействия факторов химизма и концентрации составил 12 %.

Заключение. В ходе лабораторных испытаний было установлено: минимальный токсический эффект проявляется при хлоридном засолении; максимальный – карбонатном. Концентрация сульфата и хлорида натрия до 3 г/л не обладает выраженным угнетением местных сортов овса. Сорта Отрада и Фома обладают достоверной устойчивостью к сульфату и хлориду натрия до концентрации 7 г/л. Содовое засоление (Na₂CO₃) способен выдержать только сорт Фома. Он рекомендован как родительская форма при селекции солеустойчивых сортов овса в Западной Сибири.

Работа финансировалась за счёт государственного задания FWRZ-2024-0004 и при поддержке Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня.

Литература

Семушина Л. А. Определение солеустойчивости ячменя / под ред. Г. В. Удовенко. Л. : ВИР, 1980. 14 с.

ГЕНЫ *WOX* СОВРЕМЕННОЙ КЛАДЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ *IN VITRO*

Е. П. Ефремова, В. Е. Творогова, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
efremova.bio@gmail.com

У разных видов растений способность к регенерации *in vitro* заметно различается, и во многом определяется генотипом растения. При этом помимо генотипа и физиологических особенностей растения, на этот процесс оказывают влияние многочисленные факторы, такие как свет и температура, регуляторы роста, определенный уровень pH и уровень влажности в культуральной среде. В связи с этим для каждого вида, сорта или генетической линии необходимо подбирать специфические условия культивирования *in vitro*, что осложняет разработку протоколов регенерации для широкого разнообразия видов. Понимание молекулярно-генетических механизмов, контролирующих регенерацию у растений, является не только важным шагом для изучения развития растений, но и открывает новые возможности в биотехнологии и сельском хозяйстве.

Гены семейства *WOX* (*WUSCHEL-LIKE HOMEOBOX*), кодирующие транскрипционные факторы с гомеодоменом, являются важными регуляторами клеточной пролиферации и дифференцировки у растений. Семейство генов *WOX* филогенетически подразделяется на три большие клады: современная (*WUS*), промежуточная и древняя. Представители современной клады (*WUS*, *WOX1-7*) встречаются в геномах семенных растений, а также у некоторых папоротников и преимущественно участвуют в регуляции функционирования различных типов меристем. Однако роль большинства из них в регенерации остается малоизученной.

Ранее в наших исследованиях было показано, что ген *MtWOX9-1*, представитель промежуточной клады, активирует соматический эмбриогенез как у эмбриогенной, так и у неэмбриогенной линий *M. truncatula* [The *WOX* genes ... , 2024]. Известно, что представитель современной клады, ген *MtWUS*, стимулирует соматический эмбриогенез у эмбриогенной линии *Medicago truncatula* без добавления фитогормонов в среду [WUSCHEL overexpression ... , 2021]. Мы предположили, что и другие гены *WOX* у *M. truncatula* могут оказывать влияние на соматический эмбриогенез. В рамках данного исследования мы провели агробактериальную трансформацию листовых эксплантов люцерны конструкциями со сверхэкспрессией генов *MtWOX3*, *MtWOX6-like* и оценили эффект их сверхэкспрессии на индукцию соматического эмбриогенеза и каллусообразования у эмбриогенной и неэмбриогенной линии *M. truncatula*.

Результаты, полученные в ходе наших исследований, могут оказаться полезными как для фундаментальных исследований, так и для повышения

эффективности существующих протоколов трансформации и размножения *in vitro*, что особенно важно для растений с низким регенерационным потенциалом и при получении растений с редактированным геномом.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ на создание НЦМУ «Агротехнологии Будущего», номер соглашения – 075-15-2022-322 от 22.04.2022.

Литература

The *WOX* genes from the intermediate clade: influence on the somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* / D. Yakovleva, E. Efremova, K. Smirnov [et al.] // Plants. 2024. Vol. 13, N 2. Art. 223. DOI: 10.3390/plants13020223

WUSCHEL overexpression promotes callogenesis and somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn / A. Kadri, G. De March, G. Guerineau [et al.] // Plants. 2021. Vol. 10, N 4. Art. 715. DOI: 10.3390/plants10040715

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *CESA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫХ СБОРОК ГЕНОМОВ ЛЬНА

Д. А. Жернова¹, А. А. Архипов^{1,2}, Е. Н. Пушкова¹, А. А. Дмитриев¹,
Н. В. Мельникова¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
Москва, zhernova.d@ya.ru

² Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет), Москва

Лён (*Linum usitatissimum* L.) – ценная сельскохозяйственная культура двойного назначения, из которой получают богатые лигнанами и ненасыщенными жирными кислотами семена и прочное натуральное волокно. Наиболее ценное и качественное льняное волокно получают из высоких и слабовегетящихся льнов-долгунцов. Так как протофлоэмные волокна льна должны быть прочными, но при этом сохранять эластичность, наличие лигнина в клеточных стенках волокон является нежелательным признаком. Основной каркас клеточной стенки льняного волокна составляют целлюлозные микрофибриллы, синтезируемые на поверхности мембраны целлюлозо-синтазным комплексом. Понимание генетической природы и регуляции синтеза целлюлозы в волокнах льна на разных стадиях онтогенеза и при различных условиях окружающей среды играет ключевую роль в селекционном процессе, направленном на получение сельскохозяйственно ценных генотипов.

Наше исследование нацелено на поиск генов семейства *CESA* у культурного льна. Первые попытки такого поиска [Mokshina, Gorshkova, Deuholos, 2014] на основании первой сборки генома льна [The genome of flax ... , 2012] содержали некоторые неточности из-за ошибок в сборке и

аннотации генома CDC Bethune. Уже в 2015 г. поиск был несколько оптимизирован, и результаты уточнены [Functional analyses ... , 2015], но недостатки сборки по-прежнему не позволили разрешить некоторые спорные моменты.

Развитие технологий секвенирования третьего поколения позволило получить высококачественные сборки геномов льна для сортов Атлант и YY5 [Genome sequencing ... , 2021; Chromosome-level genome ... , 2021], которые открывают возможности для дальнейшего поиска генов и исправления неточностей, присутствующих в геномных сборках, созданных только с применением данных секвенирования второго поколения. Сборки геномов Атланта и YY5 использованы нами для идентификации генов семейства *CESA*. За основу взяли последовательности белков AtCESA(1–10) *Arabidopsis thaliana*, полученные с помощью портала The Arabidopsis Information Resource при поиске по гомологии посредством blastp и по ключевым словам. В наше исследование были также включены последовательности идентифицированных ранее белков LusCESA в качестве контроля [Functional analyses ... , 2015]. Последовательность LusCESA7 получена из другой публикации [Mokshina, Gorshkova, Deyholos, 2014].

Поиск белковых последовательностей-кандидатов в продукты генов *CESA* льна проведён в геномах Атланта и YY5 двумя способами: посредством поиска по гомологии при помощи blastp и с использованием hmmer 3.4 и базы данных скрытых Марковских моделей консервативных доменов Pfam. Набор кандидатных последовательностей льна, содержащий заданный список доменов, получен посредством программы hmmsearch. Результаты подкрепляли с использованием инструмента NCBI cd-batch search. Наборы кандидатных последовательностей объединили и проверили на повторы. Для этого с использованием blastn провели поиск их кодирующих последовательностей против самих себя. Последовательности с высоким значением идентичности удалили из анализа. Далее провели множественное выравнивание всех белковых последовательностей льна и модельного *A. thaliana* при помощи программы MAFFT и построили 2 филогенетических дерева (для Атланта и YY5) посредством алгоритма RapidNJ с использованием метода neighbor joining (метод присоединения соседей) с bootstrap поддержкой 1000. Результаты визуализировали с использованием iTOL.

В результате удалось получить достаточно хорошо разрешенные филогенетические деревья для аминокислотных последовательностей *CESA*. Высококачественные сборки геномов льна позволили уточнить структуру белка CESA4, полная последовательность которого в предыдущих работах собиралась вручную из двух укороченных фрагментов. В обоих геномах, Атлант и YY5, нами идентифицирована полная последовательность CESA4. По сравнению с предыдущими исследованиями удалось уточнить структуру CESA6, так как ранее некоторые последовательности этого белка включали лишь отдельные части целлюлозо-синтазного домена. Обе

использованные нами сборки позволили получить полные последовательности CESA6 с уточненной доменной структурой. Некоторые моменты, однако, все еще требуют дополнительных изысканий. Так, при использовании сборки Атланта последовательность транскрипта H1233_022135-T1 (CESA6) неполная, без характерного домена с цинковыми пальцами, что может быть обусловлено неточностями в аннотации генома Атланта. Полную доменную структуру этой последовательности удалось получить с использованием сборки YU5.

Таким образом, высококачественные геномные сборки сортов Атлант и YU5 позволили уточнить состав генов, принимающих участие в синтезе компонентов клеточной стенки, и их доменную структуру. Знание структуры и функций генов, лежащих в основе индивидуальных характеристик волокон, необходимо для дальнейших селекционных работ, направленных на получение ценных генотипов льна-долгунца с заданными характеристиками. Однозначное соответствие последовательности в геноме и ее функциональной нагрузки открывает широкие перспективы для селекции на основе ДНК-маркеров и геномного редактирования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-64-00033, <https://rscf.ru/project/24-64-00033/>.

Литература

Chromosome-level genome assembly and annotation of the fiber flax (*Linum usitatissimum*) genome / R. Sa, L. Yi, B. Siqin [et al.] // *Frontiers in Genetics*. 2021. Vol. 12. Art. 735690. DOI: 10.3389/fgene.2021.735690

Functional analyses of cellulose synthase genes in flax (*Linum usitatissimum*) by virus-induced gene silencing / M. Chantreau, B. Chabbert, S. Billiard [et al.] // *Plant Biotechnology Journal*. 2015. Vol. 13, N 9. P 1312–1324.

Genome sequencing of fiber flax cultivar Atlant using oxford nanopore and Illumina platforms / A. A. Dmitriev, E. N. Pushkova, R. O. Novakovskiy [et al.] // *Frontiers in Genetics*. 2021. Vol. 11. Art. 590282. DOI: 10.3389/fgene.2020.590282

Mokshina N., Gorshkova T., Deyholos M. K. Chitinase-like (*CTL*) and cellulose synthase (*CESA*) gene expression in gelatinous-type cellulosic walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) bast fibers // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N 6. Art. e97949. DOI: 10.1371/journal.pone.0097949

The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled *de novo* from short shotgun sequence reads / Z. Wang, N. Hobson, L. Galindo [et al.] // *The Plant Journal*. 2012. Vol. 72, N. 3. P. 461–473.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА СИМБИОЗОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

**В. А. Жуков^{1,2,3}, Е. А. Зорин¹, А. С. Сулима¹, А. И. Жернаков¹,
Д. О. Кузьмина¹, В. А. Ракова^{1,3}, М. Л. Гордон^{1,2}, Д. А. Романюк¹,
М. С. Клюкова¹, Г. А. Ахтемова¹, О. А. Кулаева¹, О. Ю. Штарк¹,
И. А. Тихонович^{1,2,3}**

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, vzhukov@arriam.ru

² ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Краснодарский край

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – важная сельскохозяйственная культура и модельный объект генетических исследований. Горох, как и другие представители сем. Бобовые (Fabaceae), способен вступать в симбиозы с клубеньковыми бактериями (КБ) и арбускулярно-микоризными (АМ) грибами. Данные симбиозы являются взаимовыгодными: КБ фиксируют атмосферный азот, снабжая растение связанным азотом, АМ грибы способствуют поступлению труднорастворимых фосфатов в растение, а также улучшают снабжение растения водой; в свою очередь, растение предоставляет микросимбионтам питательные вещества и защищенную экологическую нишу внутри своих корней.

Различные генотипы гороха в разной степени адаптированы к образованию симбиозов: выделяют высокоотзывчивые генотипы, для которых характерна значительная прибавка ростовых параметров и семенной продуктивности под воздействием инокуляции КБ и/или АМ грибами, и низкоотзывчивые, которые не проявляют положительной реакции на инокуляцию [Mutually beneficial ... , 2012]. Молекулярно-генетические основы данного признака практически не изучены. Распространение современных технологии секвенирования привело к развитию геномики гороха, созданию сборки референсного генома гороха, экспрессионного атласа и серии молекулярных маркеров [Omics resources ... , 2021]. Использование этих инструментов делает возможным комплексный анализ признака симбиотической отзывчивости с применением «омиксных» подходов – геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики.

В работе в качестве модельной системы используются генотипы гороха, контрастные по признаку симбиотической отзывчивости: к-8274 (высокоотзывчивый) и к-3358 (низкоотзывчивый). Установлено, что низкоотзывчивый генотип не демонстрирует ответа на уровне транскриптома корневой системы при инокуляции КБ и АМ грибами в условиях нестерильной почвы, в то же время высокоотзывчивый генотип характеризуется значительными изменениями профилей экспрессии серии генов. Также для высокоотзывчивого генотипа характерно подавление развития клу-

беньков при совместной инокуляции КБ и АМ грибами, что свидетельствует о строгом контроле над развивающимися симбиозами со стороны растения. На фоне инокуляции у высокоотзывчивого генотипа к-8274 продлевается фаза налива семян, а у низкоотзывчивого, напротив, наблюдается остановка развития семян и ускорение их созревания [Profiling of seed ... , 2019].

Сопоставление транскриптомных профилей трех высокоотзывчивых генотипов и трех низкоотзывчивых позволило выявить транскриптомные маркеры симбиотической отзывчивости [Unique transcriptome ... , 2021]. К их числу относятся гены биосинтеза флавоноидов, что указывает на важную роль флавоноидного сигналинга в отпределении симбиотической отзывчивости гороха.

Секвенирование геномов и транскриптомов высокоотзывчивого сорта гороха Триумф и его родительских сортов Vendevil (высокоотзывчивый) и Classic (низкоотзывчивый) позволило выявить несколько генов, унаследованных Триумфом от Vendevil, которые демонстрируют изменение экспрессии в ответ на инокуляцию КБ и АМ грибами [Genomic and transcriptomic ... , 2023]. Один из этих генов, кодирующий гермин-подобный белок, был назван нами *PsGLP2* (*Pisum sativum Germin-Like Protein 2*). Данный ген демонстрирует повышение экспрессии в ответ на инокуляцию у высокоотзывчивых сортов Триумф и Vendevil, но не у низкоотзывчивого сорта Classic. Этот экспрессионный профиль ассоциирован с 9-нуклеотидной инсерцией в промоторной области данного гена, благодаря чему данный ген был конвертирован в ДНК-маркер, который может быть использован в селекционных программах для создания высокоотзывчивых сортов гороха при помощи маркер-ассоциированной селекции.

Применение подходов функциональной геномики позволило сделать вывод о том, что отзывчивость на инокуляцию складывается из следующих компонентов: 1) контроль со стороны растения над распространением микросимбионтов в тканях корня, 2) привлечение растением клубеньковых бактерий за счёт выделения молекул флавоноидной природы, 3) эффективность фиксации азота в клубеньках, 4) продление фазы налива семян под воздействием микросимбионтов.

Работа поддержана грантом РФФ 22-16-00109.

Литература

Genomic and transcriptomic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) breeding line 'Triumph' with high symbiotic responsivity / E. A. Zorin, A. S. Sulima, A. I. Zhernakov [et al.] // Plants. 2023. Vol. 13, N 1. Art. 78. DOI: 10.3390/plants13010078

Mutually beneficial legume symbioses with soil microbes and their potential for plant production / O. Y. Shtark, A. Y. Borisov, V. A. Zhukov, I. A. Tikhonovich // Symbiosis. 2012. Vol. 58. P. 51–62.

Omic resources and omics-enabled approaches for achieving high productivity and improved quality in pea (*Pisum sativum* L.) / A. K. Pandey, D. Rubiales, Y. Wang [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. 2021. Vol. 134. P. 755–776.

Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi / T. Mamontova, A. M. Afonin, C. Ihling [et al.] // *Molecules*. 2019. Vol. 24, N 8. Art. 1603. DOI: 10.3390/molecules24081603

Unique transcriptome features of pea (*Pisum sativum* L.) lines with differing responses to beneficial soil microorganisms / A. M. Afonin, E. S. Gribchenko, E. A. Zorin [et al.] // *Ecological genetics*. 2021. Vol. 19. P 131–141.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ СЕМЯН СОИ И ЛЬНА ПРИ ВВЕДЕНИИ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*

Ю. А. Злобина, О. Е. Кононова

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого,
Киров, ylechkaaaa@mail.ru, oksana.kononova.98@mail.ru

В современном растениеводстве активно используется культура изолированных тканей. При введении растений в условия *in vitro* важное значение имеет выбор оптимального режима стерилизации эксплантов, включающего бактериальную и грибковую инфекции растительных тканей при сохранении достаточного уровня жизнеспособности растительных клеток. При подборе стерилизующего агента необходимо учитывать как видовые, так и сортовые особенности растений, типа экспланта, а также индивидуальную чувствительность экспланта к химическим веществам [Митрофанова, 1995]. Как известно, стерилизующие агенты бывают различной природы, одними из наиболее распространенных являются хлорсодержащие растворы. Для обработки поверхности семян чаще других используются спирт (этанол и изопропанол), перекись водорода и нитрат серебра. Зачастую стерилизация проводится в несколько этапов при комбинации двух видов стерилизаторов в различных концентрациях.

Как известно, масличные культуры имеют значительную экономическую и пищевую ценность [Поморова, Овсепян, Серова, 2023; Поморова, Пятовский, Серова, 2023]. Целью данного исследования был анализ эффективности режимов стерилизации семян при введении в культуру *in vitro*: сои (*Glycine max* L.), а также льна (*Linum usitatissimum* L.). Оценка различных вариантов основывалась на соблюдении баланса жизнеспособности эксплантов и освобождением растительной ткани от микробиологических инфекций.

Объектами исследования служили 2 сорта (Цивиль и Люмария) сои и 3 сорта (Синель, Ф2102 и Ф2111) льна. Культивирование проводили на безгормональной среде Мурасиге – Скуга [Murashige, Skoog, 1962]. Перед стерилизацией семена промывали мыльным раствором в течение 10 мин, далее 15 мин под проточной водой, 10 мин дистиллированной водой. В качестве стерилизующих агентов использовали белизну торговой марки Saniterra без разведения и в разведении $\frac{1}{2}$, а также хлорамин 5 %. К каждому стерилизующему агенту было подобрано оптимальное время применения.

В эксперименте с хлорамином 100 % всхожесть показали семена льна, обработанные в течение 8 мин, увеличение времени до 10 и 15 мин привело к снижению всхожести семян на 10 и 30 % соответственно. Оптимальное время стерилизации семян сои в хлорамине составило 12 и 15 мин в зависимости от сорта.

При обработке семян льна и сои белизной в разведении $1/2$ всхожесть достигала 100 % (8–11 мин для льна, 14–16 мин для сои в зависимости от сорта). При увеличении концентрации белизны жизнеспособность семян снижалась на 42–56 %.

Подтверждено, что концентрация стерилизатора и время его применения увеличивается для семян с крупными размерами и более плотной оболочкой.

Литература

Митрофанова О. В. Использование методов биотехнологии в сохранении генофонда растений // Сессия совета ботан. садов Украины «Ботанические сады – центры сохранения биологического разнообразия мировой флоры». Ялта, 13–16 июня 1995 г. Ялта. 1995. С. 146–147.

Поморова Ю. Ю., Овсепян С. К., Серова Ю. М. Химико-биологические свойства и потенциальная ценность семян масличного льна (обзор) // Масличные культуры. 2023. № 1 (193). С. 73–84.

Поморова Ю. Ю., Пятковский В. В., Серова Ю. М. Биохимический состав семян сортов сои, возделываемых в различных регионах России, и аспекты его биологической ценности (обзор) // Масличные культуры. 2023. № 4 (196). С. 84–96.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. 1962. Vol. 15, N 3. P. 473–497.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

**А. В. Иванова, Ю. А. Немцова, П. А. Пирогова,
В. А. Воденеев, М. А. Гринберг**

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского,
Нижний Новгород, zelenkaeee@gmail.com

Растения во время роста и развития подвергаются действию различных стрессоров. Ионизирующее излучение (ИИ) является как неотъемлемой составляющей среды обитания всего живого, так и стрессором, в случае превышения фоновых значений в местах радиационных аварий, зонах выхода радиоактивных минералов и в условиях космических станций [Effect of ionizing ... , 2019]. Эффекты, оказываемые ИИ на растения, носят дозозависимый характер. Известно, что облучение в больших дозах угнетает активность ряда физиологических процессов, а в малых происходит стимуляция морфометрических показателей и увеличивается активность физиологических процессов [Genome-wide transcriptome ... , 2012; Effect of

chronic ... , 2021]. Однако для сигнальных систем радиочувствительность и характер дозовой зависимости, остаются неизученными. В настоящем эксперименте исследовано влияние ИИ на морфометрические показатели, активность физиологических процессов (фотосинтез) и параметры дистанционных электрических сигналов.

Исследования проводились на проростках пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.). Облучение сухих семян электронами с энергией 3 МэВ проводилось на линейном ускорителе в диапазоне доз 25–100 Гр, мощность дозы составляла 10 Гр/мин. В работе использовались следующие методы: определение морфометрических показателей, РАМ-флуориметрия и регистрация электрических сигналов. Электрический сигнал индуцировался нагревом кончика листа в кювете с водой.

Было обнаружено, что морфометрические показатели, активность фотосинтеза и сигнальные системы растений отличаются в своей радиочувствительности. Наиболее радиочувствительным показателем оказались электрические сигналы, так как изменения амплитуды реакции и время ее возникновения начиналось с меньшей из исследуемых доз (25 Гр). ИИ вызывает дозозависимое подавление активности фотосинтеза, которое проявляется в снижении квантового выхода фотосистемы 2 (Φ_{PSII}), приобретая статистическую значимость начиная с 50 Гр, при этом нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ) при исследованных дозах не изменяется. Морфометрические показатели обладают меньшей радиочувствительностью, в сравнении с остальными параметрами, так как изменения показателей роста листьев и корней начинаются с 75 Гр.

Работа выполнена при поддержке программы 10 Экспериментальная Лабораторная Астрофизика и Геофизика НЦФМ.

Литература

Effect of chronic β -radiation on long-distance electrical signals in wheat and their role in adaptation to heat stress. / M. Grinberg, S. Gudkov, I. Balalaeva [et al.] // Environmental and Experimental Botany. 2021. Vol. 184, N 2. DOI:10.1016/j.envexpbot.2021.104378

Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants / S. Gudkov, M. Grinberg, V. Sukhov [et al.] // J Environ Radioact. 2019. Vol. 202. P. 8–24.

Genome-wide transcriptome profiling of ROS scavenging and signal transduction pathways in rice (*Oryza sativa* L.) in response to different types of ionizing radiation / S. Kim, M. Song, K. Lee [et al.] // Mol Biol Rep. 2012. Vol. 39, N 12. Art. 11231–48. DOI: 10.1007/s11033-012-2034-9

НАСЛЕДОВАНИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ У ГИБРИДОВ F1 СОРГО НА ОСНОВЕ A2, A3, A5 ТИПОВ ЦИТОПЛАЗМ

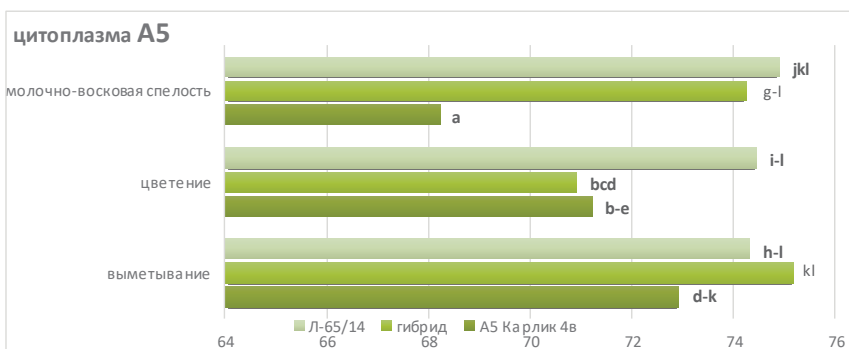
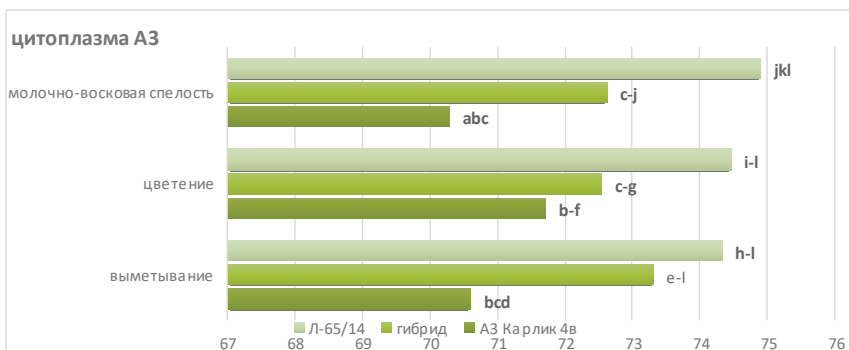
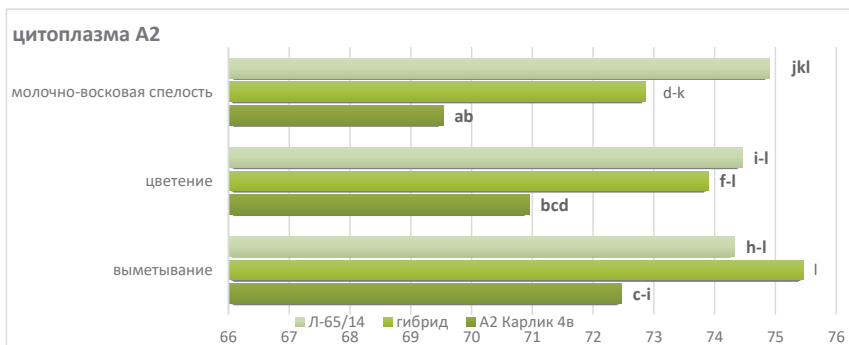
О. П. Кибальник

Российский научно-исследовательский и проектно-технологический институт сорго и кукурузы», Саратов, kibalnik79@yandex.ru

Несмотря на значительную адаптированность сорго к произрастанию в условиях недостатка влаги, разными исследователями обнаружены генотипы, которые проявляли слабую устойчивость к засухе [Reddy, Patil, 2015]. Согласно литературным данным, реакция на абиотический стрессор отличалась в зависимости от фазы вегетации растений [Drought stresses ... , 2019] и может передаваться по наследству [Recent Advances ... , 2011]. Следует отметить, что для создания гетерозисных гибридов важно подбирать родительские формы, характеризующиеся различными генотипическими и фенотипическими особенностями. Так, в селекционную работу вовлекаются ЦМС-линии, полученные с использованием генетически различных типов стерильных цитоплазм. Исследования проведенные ранее показали, что цитоплазмы A2 и A5 способствовали увеличению оводненности тканей листьев по сравнению с цитоплазмой A3 [Kibalnik, 2023]. В этой связи целью исследований являлось изучение оводненности тканей листьев у гибридов сорго на основе A2, A3, A5 типов стерильных цитоплазм в зависимости от фазы развития растений.

В качестве объектов исследований (всего 7) в 2023 г. использовали ЦМС-линии – A2 Карлик 4в, A3 Карлик 4в, A5 Карлик 4в; селекционная линия Л-65/14; гибриды F1. Следует отметить, что линия Л-65/14 характеризуется высокой засухоустойчивостью по такому показателю водного режима листьев, как оводненность тканей [Influence of Abiotic ... , 2023]. Водный режим листьев у гибридов и родительских форм изучали в следующие фазы развития – выметывание, цветение, молочно-восковая спелость.

Сравнительный анализ гибрида на основе цитоплазмы A2 с геномом Карлика 4в с родительскими формами выявил существенные различия между ЦМС-линией и гибридом в каждую фазу. Установлено, что оводненность тканей выше у гибрида. Значение признака у гибрида на основе цитоплазмы A3 оказалось значимо выше материнской формы в фазу выметывание и молочно-восковую спелость – 72,96–73,32 % и 70,29–70,60 % соответственно. У гибрида на цитоплазме A5 оводненность выше ЦМС-линии в фазу молочно-восковой спелости – 74,26 и 68,25 %, соответственно. Следует отметить, что гибриды на цитоплазмах A2, A3 и A5 значимо не отличались по оводненности от отцовской формы в изучаемые фазы вегетации. При этом только у гибрида на цитоплазме A5 показатель признака в цветение оказался ниже, чем у отцовской формы – 70,91 и 74,46 % соответственно. Так, доминирование гибридов по оводненности отмечено только в фазу выметывание на основе цитоплазм A2 и A5. В остальные фазы у гибридов на основе изучаемых типов ЦМС наблюдалось промежуточное наследование признака (рис.).



$F_{05} = 8,07^*$; $HCP_{05} = 2,04$

Рис. Оводненность тканей (%) в листьях гибридов на основе цитоплазм A2, A3, A5 и их родительских форм сорго в разные фазы вегетации

Литература

- Drought stresses on seed germination and early growth of maize and sorghum / M. S. Queiroz, C. E. Oliveira, F. Steiner // *Journal Agricultural Science*. 2019. Vol. 11, N 2. P. 310–318.
- Influence of Abiotic Stresses on Morphophysiological Characteristics and Biological Value of Grain *Sorghum bicolor* (L.) Moench / O. P. Kibalnik, I. A. Sazonova, Yu. V. Bochkareva [et al.] // *International Journal of Plant Biology*. 2023. Vol. 14. P. 150–161.
- Kibalnik O. P. The influence of meteorological conditions on the parameters of the water regime of cms-lines sorghum leaves // *Polythematic Online Scientific Journal of Kuban State Agrarian University*. 2023. N 190. P. 21–27.
- Recent Advances in Sorghum Genetic Enhancement Research at ICRISAT / A. A. Kumar, D. V. S. Reddy, H. C. Sharma [et al.] // *American Journal of Plant Sciences*. 2011. Vol. 2. P. 589–600.
- Reddy P. S., Patil J. V. Genetic enhancement of Rabi Sorghum: Adapting the Indian Durra. London: Academic Press, 2015. 248 p.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ МАСЛИЧНОГО РАПСА С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕРБИЦИДОСТОЙЧИВЫХ ДН-ЛИНИЙ

Е. В. Козарь, Е. А. Домблидес

Федеральный научный центр овощеводства, Одинцово
koz.leno4ek@gmail.com

Рапс – это травянистое растение семейства капустные (*Brassicaceae* L.), он является аллотетраплоидом ($2n = 38$) с двумя геномами А и С, и произошел от межвидового скрещивания *Brassica campestris* L., донора генома А, и *Brassica oleracea* L., донора генома С. Геном А имеет десять хромосом, а геном С – девять [Imidazolinone-Tolerant Crops ... , 2005]. Рапс является важной масличной культурой во всем мире, его производство растет год от года.

Одним из важнейших параметров, определяющих рентабельность выращивания рапса, является его урожайность. На урожайность данной культуры влияет множество фактов, в том числе засоренность полей сорняками, которые конкурируют с рапсом за солнечный свет, воду, питательные вещества в почве и физическое пространство в полевых условиях, что представляет собой серьезную проблему и ограничивает урожайность данной культуры, снижая ее на 23–64 % по сравнению с контролями без сорняков [Bijan-zadeh, Naderi, Behpoori, 2010; Synergistic Mutations ... , 2020]. С другой стороны, наличие сорняков ухудшает качество сырья, так как наличие семян сорняков среди рапса снижает качество масла и затрудняет его переработку. Создание устойчивых к гербицидам сортов и гибридов рапса является приоритетным направлением селекции, как один из наиболее эффективных инструментов борьбы с сорняками [Imidazolinone-Tolerant Crops ... , 2005]. Гербициды, к которым выведены устойчивые формы рапса можно разделить на шесть групп: глүофосинаты,

глифосаты, бромоксинылы, имидазолиноны, триазинины и сульфонилмочевины [Goncharov, Gorlova 2018]. Рапс устойчивый к имидазолинонам, триазининам и сульфонилмочевинам был выведен путем традиционной селекции растений, что привлекательно для стран, где запрещено выращивание ГМО культур. Имидазолиноновая группа гербицидов привлекательна не только потому, что устойчивость к ней появилась без редактирования генома, но и ввиду низкой токсичности этой группы гербицидов для млекопитающих и низких норм внесения. Имидазолиноновые гербициды были разработаны в 1980-х гг., устойчивые сорта и гибриды к имидазолинонам коммерциализируют под торговой маркой производственной системы Clearfield® («чистое поле») [Goncharov, Gorlova, 2018], в названиях сортов и гибридов указывается аббревиатура «CL». Имидазолиноны относятся к одним из пяти химических семейств гербицидов, ингибирующих АНАС. Ацетолактатсинтаза (ALS или АНАС) является ключевым ферментом для биосинтеза аминокислот с разветвленной цепью. У масличного рапса было зарегистрировано пять локусов АНАС. Три локуса: АНАС2, АНАС3 и АНАС4 происходят из генома А, два локуса: АНАС1 и АНАС5 происходят из генома С [Molecular Characterization ..., 1991]. Из них гены АНАС1 и АНАС3 конститутивно экспрессируются и кодируют основные активности АНАС, необходимые для роста и развития *B. napus*. Мутации именно в этих генах и определяют устойчивость масличного рапса к имидазолинонам (BnАНАС1R (Ser653Asp), BnАНАС3R(Trp574Leu)) [Kozar, Domblides 2024]. Наличие даже одной мутации уже обеспечивает некоторую степень устойчивости рапса к имидазолинонам, однако для промышленного производства важно чтобы устойчивость была очень высокой, чтобы при варьировании обработки гербицидами была полная уверенность, что рапс не повредится. Ввиду этого, для коммерческого использования предпочтительны формы с обеими мутациями одновременно, так как они оказывают синергетический эффект в отношении устойчивости, в том числе, было показано, что данные мутации максимально эффективны в гомозиготном состоянии аллелей. Ввиду этих аспектов ведение селекции на устойчивость к имидазолинонам без применения ДН-технологий затруднено.

Однако рапс хорошо отзывчивая культура к ДН-технологиям, что позволяет получить с 5 бутонов сотни, а иногда и тысячи эмбриоидов, что приводит к тому, что невозможно вести работу по всем получившимся генотипам и еще на этом этапе большая часть ценного материала не включается в дальнейшую работу. С другой стороны, материал, который пошел в работу не был отобран по признаку устойчивости и данный отбор предстоит провести либо с помощью маркерной селекции, когда эмбриоиды дорастут до такого состояния, что будет возможным отобрать материал, либо, если нет технической возможности по маркерной селекции, отбор по признаку устойчивости проводят на поздних этапах онтогенеза растения, что влечет за собой большие временные и трудовые затраты.

Поэтому очень важно найти способ отбора эмбриоидов гаплоидного происхождения на самых ранних этапах, например, на стадии индукции эмбриогенеза.

Нами был проведен опыт по поиску жидких индукционных селективных сред для микроспор. Было показано, что добавление гербицида в жидкую питательную среду для индукции эмбриогенеза существенно влияет на урожайность эмбриоидов, так доля влияния фактора добавления гербицида в питательную среду на урожайность эмбриоидов составила от 33 до 43 % в зависимости от генотипа, доля влияния генотипа составила 49 и 20 %, а доля влияния взаимодействия генотип*обработка гербицидом составила 15 и 35 % в зависимости от линейного размера бутонов. Добавление 50 мг/л имозамокса (гербицид идидазолиноновой группы) полностью ингибировало развитие эмбриоидов даже у селекционного образца, взятого в качестве стандарта устойчивости. Эти данные демонстрируют высокий потенциал использования селективных индукционных сред для раннего отбора генотипов на признак устойчивости к гербицидам. В настоящее время ДН-растения, полученные на селективных средах, доращиваются в контролируемых условиях для получения их семенного потомства, для его дальнейшего тестирования на устойчивость к гербицидам с целью валидации полученных фенотипических данных с данными по селективным средам и определению наиболее эффективного состава селективной среды для целей отбора растений на устойчивость к гербицидам.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-76-01070, <https://rscf.ru/project/23-76-01070/>.

Литература

- Bijanazadeh E., Naderi R., Behpoori A. Interrelationships between Oilseed Rape Yield and Weeds Population under Herbicides Application // Australian journal of crop science. 2010. Vol. 4, N 3. P. 155–162.
- Goncharov S. V., Gorlova L. A. Herbicide Tolerance in Rapeseed Breeding: Results and Prospects // Oilseed crops. 2018. Vol. 176, N 4. P. 42–47.
- Imidazolinone-Tolerant Crops: History, Current Status and Future / S. Tan [et al.] // In Pest Management Science. 2005. Vol. 61, N 3. Art. 246-57. DOI: 10.1002/ps.993
- Kozar E. V., Domblides E. A. Imidazolinone Resistance in Oilseed Rape (Brassica Napus L.): Current Status, Breeding, Molecular Markers and Prospects for Application in Hybrid Seed Purity Improvement. 2024. Vol. 10, N 6. Art. 553. DOI: 10.3390/horticulturae10060553
- Molecular Characterization and Genetic Origin of the Brassica Napus Acetohydroxyacid Synthase Multigene Family / R. G. Rutledge, T. Quellet, J. Hattori, B. L. Miki // Mol Gen Genet. 1991. Vol. 229, N 1. DOI: 10.1007/BF00264210.
- Synergistic Mutations of Two Rapeseed AHAS Genes Confer High Resistance to Sulfonylurea Herbicides for Weed Control / Guo Yue [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. 2020. Vol. 133, N 10. P. 2811–2824. DOI:10.1007/s00122-020-03633-w
- Thelen J. J., Ohlrogge J. B. Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants // Metabolic Engineering. 2002. Vol. 4, N 1. P 12–21.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ И АННОТИРОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТНОГО ГЕНОМА РЕДКИХ И МАЛОИЗУЧЕННЫХ ВИДОВ ПШЕНИЦ РЯДА TURGIDUM-AESTIVUM

А. Р. Кулуев, Р. Т. Матниязов, А. В. Чемерис

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа
kuluev.azat91@yandex.ru

Во многих частях земного шара одной из основных хлебных культур является пшеница, причем разные ее виды, некоторые из которых малоизучены. Поэтому вполне объясним непреходящий интерес к этим важным для пропитания человечества злакам. Долгое время исследования пшеницевых ограничивались только ботаническими описаниями видов. Лишь столетие назад цитологические исследования позволили установить уровни пloidности разных видов, что привело к лучшему пониманию их систематики и перевело исследования пшеницевых на новую ступень. Затем добавились биохимические и иммунохимические методы, позволившие приблизиться к выяснению родства и систематического положения пшениц и их диких сородичей. Наступивший XXI в. благодаря появившимся высокопроизводительным методам полногеномного секвенирования позволил ответить на ряд важных вопросов происхождения и эволюции пшениц, однако чтобы уверенно говорить о донорах всех субгеномов полиплоидных форм пшениц предстоит пройти еще немалый путь. Сейчас считается общепринятым, что полиплоидные пшеницы рода *Triticum* имеют дифилетическое происхождение и формируют собой два полиплоидных ряда – *turgidum-aestivum* и *timopheevii-zhukovskiyi*, в которых есть как тетраплоидные, так и гексаплоидные виды [Жонарев, Гаврилюк, Мигушова, 1974]. Одним из основных отличий между этими рядами на тетраплоидном уровне служит материнский эгилосный субгеном, обозначаемый для них соответственно, как В и G, с наибольшей вероятностью принадлежащий *Ae. speltoides* или близкому к нему виду – либо до сих пор не обнаруженному, либо уже вымершему. Однако в настоящее время сложилась ситуация, что вековой спор о происхождении материнского субгенома тетраплоидных пшениц и филогенетического родства различных видов тетра- и гексаплоидных пшениц по материнской линии может быть разрешен с помощью высокопроизводительного секвенирования, позволяющего относительно легко определять полные последовательности хлоропластных геномов, поскольку они как раз наследуются по материнской линии. При этом производившееся ранее секвенирование отдельных хлоропластных генов или только их небольших участков не давало необходимую исчерпывающую информацию и не может по точности и полноте анализа сравниться с данными полногеномного секвенирования. Поэтому целью нашего исследования явилось секвенирование и аннотирование полных хлоропластных геномов малоизученных и спорных видов

пшеницевых. Данная работа выполняется в рамках проекта РНФ «Фило-генетические взаимоотношения отдельных видов пшенично-эгилопсного комплекса разных уровней ploидности через призму их полных хлоро-пластных геномов с прицелом на происхождение В- и G-субгеномов по-липлоидных форм пшениц линий *turgidum-aestivum* и *timopheevii-zhukovskiy*». В результате выполнения проекта во второй год исследова-ния были секвенированы в общей сложности полные хлоропластные ге-номы 5 видов пшенично-эгилопсного комплекса ряда *turgidum-aestivum* – *T. polonicum*, *T. turanicum*, *T. aethiopicum*, *T. persicum*, *T. vavilovii*. В первый год исследования была выявлена близость *T. militinae* по хлоропластному геному к *T. turgidum* и *T. aestivum*. По полученным данным можно пред-положить, что *T. militinae* является гибридом *T. persicum* и *T. timopheevii*, причем первый вид явился материнской формой. Этот вывод можно сде-лать, исходя из более близкого родства хлоропластного генома *T. militinae* с видами ряда *turgidum-aestivum*, к которому относится *T. persicum* и по данным скрещивания *T. persicum* с *T. timopheevii*. С высокой вероятно-стью эти сведения указывают на ее рукотворное создание А. Р. Жебраком в 1930–1940-х гг., проводившим различные скрещивания с участием пшеницы Тимофеева, в том числе с белоколосой, красноколосой и чер-ноколосой формами пшеницы *T. persicum*, как в качестве материнской, так и отцовской форм – *T. persicum* v. *Stramineum* × *T. timopheevii*; *T. timopheevii* × *T. persicum* v. *rubiginosum*; *T. persicum* v. *fuliginosum* [Же-брак, 1944]. При этом сейчас существуют белоколосая и черноколосая фор-мы *T. militinae*, по всей видимости, являющиеся именно теми гибридами.

В настоящий момент мы проводим биоинформатический анализ и аннотирование нуклеотидных последовательностей хлоропластных гено-мов 5 малоизученных видов ряда *turgidum-aestivum*. Данные, полученные в ходе выполнения проекта, позволят воссоздать более полную картину филогенетических взаимоотношений в пшенично-эгилопсном комплексе и дадут возможность прояснить целый ряд спорных моментов их систе-матики.

Литература

- Жебрак А. Р. Синтез новых видов пшениц. М. : Сельхозгиз, 1944. С. 53.
Конарев А. В., Гаврилюк И. П., Мигушова Е. Ф. Дифференциация диплоидных пшениц по данным иммунохимического анализа глиадинов // Доклады Всесоюзной Академии Сель-скохозяйственных наук им. В. И. Ленина. 1974. № 6. С. 12.

**ВВЕДЕНИЕ ЭНДЕМИКА ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ
THERMOPSIS LANCEOLATA R. BR. SUBSP. *JACUTICA* (CZEFR.)
SCHRETER В КУЛЬТУРУ *IN VITRO***

**Е. В. Кучарова, Ю. А. Егоров, Д. Е. Ксенофонтов,
А. П. Заболоцкая, Ж. М. Охлопкова**

Северо-Восточный федеральный университет, Якутск,
oleneek@mail.ru, egorov.y.a@s-vfu.ru, darkhan2001@list.ru
anitazabolotskaya@icloud.com, zhm.okhlopkova@s-vfu.ru

Сохранение биоразнообразия является одной из главных проблем современного мира в виду нарастания изменений климатических факторов и антропогенного воздействия. В особо опасном положении находятся редкие и исчезающие растения северных и арктических территорий, где идет активное промышленное освоение и внедрение новых видов добычи и производства. Одним из редких видов растений Республики Саха (Якутия) является эндемик Центральной Якутии – *Thermopsis lanceolata jacutica*. Термописис якутский представляет собой многолетнее растение, занесенное в Красную книгу Якутии по категории и статусу редкости «2 а» как подвид, численность которого сокращается в результате разрушения местообитаний [Красная книга ... , 2017]. Вид распространен на Лено-Амгинском междуречьи, произрастает в большинстве случаев на остепнённых лугах и склонах, семена завязывает в небольшом количестве [Борисова, Данилова, Иванова, 2011]. Трава термописиса якутского активно собирается на лекарственное сырье, содержит алкалоиды до 2,7 % [Макаров, 2002].

Цель и задачи. Целью работы является введение эндемика Центральной Якутии *Thermopsis lanceolata jacutica* в культуру *in vitro*. Для этого нами решались следующие задачи: разработать протокол стерилизации семян, выполнить инициацию побегообразования *in vitro* на основе отобранных эксплантов, выполнить инициацию каллусогенеза, выделить и проанализировать качество ДНК из образцов каллусной ткани термописиса якутского к последующему изучению генетической стабильности при введении объекта исследования в культуру *in vitro*.

Материал и методы. Семена термописиса якутского были собраны на территории ботанического сада ИБПК СО РАН в августе 2023 г. Разработан и апробирован эффективный протокол стерилизации семян: первоначально семена обрабатывали 5%-ным раствором гипохлорида натрия в течение 10 мин с промывкой дистиллированной водой трижды, затем работали 70%-ным этиловым спиртом в течение 3 мин с последующей трехразовой промывкой простерилизованной дистиллированной водой. Обработанные семена высаживали в стерильных условиях на подготовленные чашки Петри с питательной средой МС без фитогормонов, по пять семян на чашку. Проращивание семян проводили в темноте при комнат-

ной температуре. После проклеивания семян чашки переносили в условия фитостеллажа со светодиодным освещением на фотопериод 16/8. На 60-е сут. проращивания на проростках появлялись до 4–5 настоящих листьев.

Часть проростков термопсиса якутского была использована для инициации побегообразования с пересадкой на питательную среду МС с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). На листовых эксплантах из второй половины проростков был иницирован первичный каллусогенез на питательной среде МС с добавлением по 1 мг/л БАП и 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). При этом в каждую ч. Петри помещали по пять листовых эксплантов. Культивирование проводили в темноте при комнатной температуре.

Выделение геномной ДНК производили из каллусной ткани термопсиса якутского навеской в 150 мг с помощью набора Hi Pure HP Plant DNA Kit. Качественный и количественный анализ выделенных образцов ДНК проводили на спектрофотометре SPECTROstar Omega (BMG LABTECH, Германия) с микропланшетом LVsplate и на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Выделенные образцы ДНК хранятся при –38 °С в лабораторном морозильнике.

Результаты исследования. Разработан и апробирован эффективный протокол обработки семян редкого вида растения термопсиса якутского для введения в культуру. Получены стерильные проростки объекта исследования с изучением динамики роста в условиях *in vitro*. Получены первичные каллусные культуры клеток термопсиса якутского на 14-ые сутки после посадки листовых эксплантов на питательную среду МС с добавлением фитогормонов БАП и 2,4-Д. Первичные каллусы обладали светло-желтой окраской и имели рыхлую мягкую структуру. Полученные варианты первичных каллусов термопсиса якутского были пересажены на питательные среды МС с добавлением различных концентраций 2,4-Д, БАП и α -нафтилуксусной кислоты для изучения динамики роста биомассы каллусов и отбора оптимального состава питательной среды для получения стабильно растущих каллусных культур. Из восьми вариантов образцов каллусной ткани термопсиса якутского выделены геномные ДНК с соотношением оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, 1,8–2,1 до 460 нг/мл.

Заключение и перспективы исследования. Настоящее исследование позволило впервые выполнить введение редкого вида растения, эндемика Центральной Якутии *Thermopsis lanceolata jacutica*, представляющего интерес в качестве растительного лекарственного сырья, в культуру *in vitro*. В настоящее время выполняются эксперименты по разработке оптимальной питательной среды к получению стабильно растущих каллусных культур, и заложены работы к последующему изучению генетической стабильности термопсиса якутского при микроклональном размножении.

Исследование выполнено в Северо-Восточном федеральном университете за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-20031, <https://rscf.ru/project/22-14-20031/>.

Литература

Борисова С. З., Данилова Н. С., Иванова Н. С. Состояние ценопопуляций эндемика Центральной Якутии *Thermopsis lanceolata* subsp. *jacutica* (Czeffr.) Schreter в окрестностях г. Якутска // Вестник СВФУ им. М. К. Аммосова. 2011. Т. 8, № 4. С. 14–23.

Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / отв. ред. Н. С. Данилова. М. : Реарт, 2017. 412 с.

Макаров А. А. Лекарственные растения Якутии и перспективы их освоения. Новосибирск : Изд-во СО РАН, 2002. 263 с.

ТЕХНОЛОГИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛИСТЬЕВ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

Б. Ж. Ламаханова, Г. П. Ламажапова, Э. В. Сынгеева

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления
Улан-Удэ, lamakhanova02@mail.ru

Работа направлена на разработку эффективной технологии извлечения биологически активных веществ (БАВ) из листьев смородины черной. Для этого использовался метод обработки растительного сырья этанолом [Ламаханова, 2023; Ламаханова, Сынгеева, Ламажапова, 2023].

Смородина черная *Ribes nigrum*, известна своими многочисленными преимуществами для здоровья человека, обусловленные их фитохимическим составом. Листья этого растения содержат множество биологически активных веществ, таких как витамины и полифенолы, которые включают флавоноиды и дубильные вещества. Доказано, что все эти соединения обладают антиоксидантным действием, которое отвечает за многочисленные преимущества для здоровья [Phenolic compounds ... , 2015].

Объектом исследования были взяты листья черной смородины – сибирский представитель семейства камнеломковых – *Ribes nigrum* L, собранные в конце августа – начало сентября 2023 г. на территории Республики Бурятия, Иволгинского района в с. Нур-Селение.

Листья предварительно сушат при комнатной температуре $t = 25 \pm 2$ °C без доступа к солнечному свету до остаточной влажности 5 %. Далее высушенные листья черной смородины измельчают до частиц $d = 2 \pm 1$ мм.

Согласно некоторым исследованиям, температура процесса экстрагирования влияет на содержание биологически активных веществ в извлечениях растительного сырья. Поскольку повышение температурного воздействия способствует разрушению витамина С, лучше извлекать его при комнатной температуре, а дубильные вещества и флавоноиды – при

100 °С [Ламаханова, 2023; Ламаханова, Сынгеева, Ламажапова, 2023]. Следовательно, для извлечения БАВ было использовано несколько режимов мацерации. Растворы этанола с различной концентрацией (40 %, 50 %, 60 %, 70 %) использовались в качестве экстрагентов. Метод экстрагирования – мацерация. Соотношение сырья к экстрагенту составило 1:10. После завершения процесса экстракции экстракты фильтровались для удаления нерастворимых частиц, что привело к созданию чистой вытяжки. В полученных вытяжках определяли витамин С на 3-е, 5-е, 7-е и 10-е сут. титриметрическим методом с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Установлено, что в экстрактах наибольший выход витамина С происходил на 5-е сут. при 50%-ной концентрации этанола.

Чтобы выяснить время кипячения, при котором извлекается больше экстрактивных веществ, оставшийся шрот после извлечения витамина заливали этанолом тех же концентраций в соотношении 1:15, и кипятили в течение 30, 45 и 60 мин при температуре 100 °С. Наибольший выход экстрактивных веществ составил при кипячении в течение 60 мин. Этот режим был принят для проведения дальнейших исследований.

Для дальнейших исследований были взяты оставшиеся шроты после экстракции витамина С при различных режимах, чтобы определить содержание дубильных веществ и флавоноидов. Анализ исследования дубильных веществ после вторичной экстракции показал, что наибольшее извлечение приходится на 5-е сут. при экстрагировании 40%-ным этанолом, а содержание флавоноидов на 3-е сут. при 70%-ной обработке спиртом.

Так как в полученных экстрактах, в зависимости от режимов, количество извлеченных БАВ различны, поэтому на завершающем этапе оставшиеся фильтраты, полученные холодной экстракцией при различных режимах и фильтрат после кипячения в течение 60 мин объединяли, и проводили анализ по определению суммарного содержания антиоксидантов в объединенных пробах. Наибольшее суммарное содержание антиоксидантов проявляется на 5-е сут. при 50%-ной концентрации спирта.

По результатам исследований были подобраны параметры и режимы экстракции, при которых наблюдались наибольшее содержание витамина С и других БАВ [Ламаханова, 2023], также была разработана технологическая схема извлечения БАВ из листьев смородины черной, представленная на рисунке.

Разработана технология, которая позволяет эффективно извлекать и сохранять БАВ из листьев смородины черной. Это открывает новые перспективы для создания функциональных продуктов на основе черной смородины.

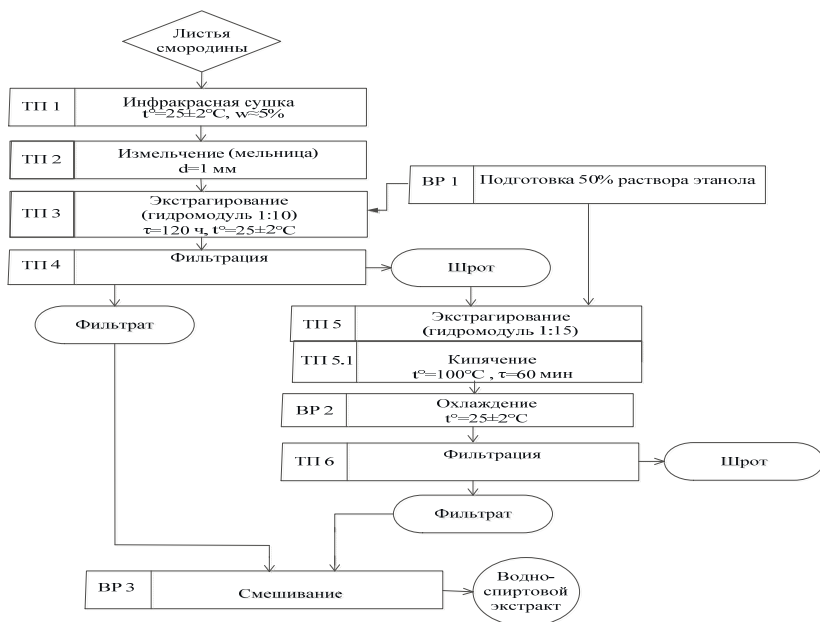


Рис. Технологическая схема извлечения биологически активных веществ из листьев смородины черной

Литература

Ламаханова Б. Ж., Сынгеева Э. В., Ламажапова Г. П. Подбор параметров и режимов экстракции, дающих максимальный выход биологически активных веществ из листьев *Ribes nigrum* // *Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы современной науки, достижения и инновации* : сб. науч. ст. по материалам XIII Междунар. науч.-практ. конф., 15 дек. 2023 г., в 3 ч. Ч. 1. Уфа : НИЦ Вестник науки, 2023. С. 159–163.

Ламаханова Б. Ж. Получение экстракта из листьев *Ribes nigrum* // *Инновационные научные исследования в современном мире* : сб. тр. науч.-исследовательских работ по материалам XV Всерос. конкурса (25 дек.). Уфа : НИЦ Вестник науки, 2023. С. 28–33.

Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date / M. Vagiri, S. Conner, D. Stewart [et al.] // *Food Chem.* 2015. Vol. 172. P. 135–142.

СВЯЗЬ ИММУНОГЕННОСТИ АВЕНИНОВ ОВСА ПОСЕВНОГО С АЛЛЕЛЬНЫМ СОСТАВОМ АВЕНИН-КОДИРУЮЩИХ ЛОКУСОВ

А. В. Любимова, Д. И. Ерёмин, А. К. Таутекенова, М. Н. Фомина

НИИСХ Северного Зауралья – филиал ТюмНЦ СО РАН, Тюмень

ostapenkoav88@yandex.ru

Овес – ценная сельскохозяйственная культура, широко используемая как на кормовые цели, так и для питания человека. Зерно овса богато незаменимыми аминокислотами, витаминами группы В, содержит большое количество β-глюканов. Все это позволяет успешно использовать эту культуру в целях диетического и функционального питания. В настоящее время интерес к овсу значительно возрос из-за его гипоаллергенных свойств – продукты из овсяного зерна считаются безопасными для употребления в пищу для большинства людей, страдающих целиакией. Целиакия – пищевая аллергия, выражающаяся в непереносимости глютена – запасного белка пшеницы и родственных ей злаков. Овес отличается от других злаковых культур значительно меньшим содержанием запасных белков – авенинов и их строением, том числе тем, что в состав этих белков входит значительно меньше пролина – аминокислоты, которая вызывает иммунный ответ в организме. Однако показано, что иммуногенность овса зависит от сорта [Identification of Perspective ... , 2020]. Авенины овса наследуются блоками и контролируются тремя кластерами генов, именуемыми авенин-кодирующие локусы (АКЛ) *Avn A*, *Avn B*, *Avn C*. В этой связи приобретает важное значение понимание зависимости связи токсических свойств авенинов с контролируемыми их синтез аллелями АКЛ. Целью нашей работы являлось определение связи иммуногенности авенинов сортов овса посевного, районированных в Тюменской области, с аллельным составом авенин-кодирующих локусов.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили сорта овса посевного, включенные в государственный реестр селекционных достижений по Тюменской области в период с 1929 по 2024 г., а также сорт Радужный селекции ТюмНЦ СО РАН. Сорта выращивали на опытном поле НИИСХ Северного Зауралья – филиал ТюмНЦ СО РАН в 2022 и 2023 гг. Почва опытного поля – темно-серая лесная. Погодные условия 2022 и 2023 гг. существенно отличались: 2022 г. был теплым и умеренно влажным, а 2023 характеризовался сухой и жаркой погодой всего вегетационного периода. Определение количества глютена в зерне проводили по ранее описанной методике [Любимова, Еремин, Фомина, 2023], использовали тест-системы AgraQuant глютен G12 (Romer Labs, Австрия) с антителом G12. Тесноту связи между частотой встречаемости аллелей АКЛ и содержанием глютена в сортах оценивали с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. В результате исследований установлено, что сорта отличались по содержанию глютена в зерне как друг от друга, так и в пределах одного сорта по годам (табл.).

Таблица 1

Содержание глютена (мг/кг) в сортах овса посевного урожая 2022–2023 гг.

№ п/п	Сорт	Содержание глютена в зерне, мг/кг		Формула авенина
		2022 г	2023 г	
1	Победа	3,27	< LOD	<i>A2+11 B11 C2</i>
2	Золотой дождь	2,58	2,32	<i>A2 B8 C2</i>
3	Орел	< LOD	< LOD	<i>A11 B11 C2</i>
4	Ударник У-883	2,78	< LOD	<i>A9 Bnew C3</i>
5	Нидар	2,14	< LOD	<i>A2 B8 C2</i>
6	Северянин	2,69	< LOD	<i>A9+new B11+1 C3</i>
7	Скороспелый	5,73	2,53	<i>Anew Bnew2 C3</i>
8	Нарымский 943	3,78	2,27	<i>A5+2 B1+4 C1+2</i>
9	Тажник	3,56	< LOD	<i>A2+1 B8 C2</i>
10	Астор	3,32	< LOD	<i>A2 B4 C2</i>
11	Сельма	2,26	< LOD	<i>A4 B4+1 C2</i>
12	Мегион	4,79	2,50	<i>A2+9 B7 C5</i>
13	Новосибирский 88	2,84	< LOD	<i>A2 B4 C2</i>
14	Тюменский голозерный	2,39	3,80	<i>A2 B7 C3</i>
15	Талисман	3,38	10,50	<i>A11 B4 C2</i>
16	Ограда	6,01	3,11	<i>A10+11 B4 C8</i>
17	Фома	5,02	2,91	<i>A11 B11 C8</i>
18	Тоболяк	7,48	< LOD	<i>A4 B8 C2</i>
19	Радужный	3,60	2,55	<i>A2 B2 C6</i>

Примечание: < LOD – содержание глютена в зерне меньше предела обнаружения (менее 2 мг/кг).

В зерне урожая 2022 г. максимальное содержание глютена отмечено в сорте Тоболяк – 7,48 мг/кг, а в 2023-м – в зерне сорта Талисман (10,50 мг/кг). В 2023 г. количество сортов, содержание глютена в которых было ниже предела обнаружения, составило 10 шт., тогда как в 2022-м подобное было отмечено только для сорта Орел. Вероятно, это связано с более благоприятными погодными условиями 2023 г. Жаркие и засушливые условия 2022 г. могли повлиять на биосинтез различных фракций авенинов и привести к повышению содержания иммуногенных белков.

Для того чтобы определить взаимосвязь между иммуногенностью сортов и аллелями АКЛ применили коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всей выборки сортов определена умеренная положительная связь между содержанием глютена и аллелями локуса *Avn C* – коэффициент корреляции составил 0,50 и 0,57 в 2022 и 2023 гг. соответственно ($p < 0,05$). Возможно, проламины, синтез которых контролируется данным локусом, в наибольшей степени реагируют на изменения почвенно-климатических условий возделывания растений. Для определения конкретных аллелей АКЛ, с которыми связана иммуногенность сортов в раз-

ные годы, все изученные образцы были разделены на группы по содержанию глютена: до 2 мг/кг, 2–3 мг/кг, 3–4 мг/кг ... 10–11 мг/кг глютена.

В результате только в зерне урожая 2023 г. определена связь между содержанием глютена и аллелями АКЛ. Коэффициент корреляции составил: $A2 - 0,68$, $A11 - 0,99$, $B4 - 0,99$, $B7 - 0,62$, $C2 - 0,77$, $C3 - 0,69$ и $C8 - 0,62$ ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что аллели $A11$, $B4$ и $C2$ встречаются как в сортах с содержанием глютена ниже предела обнаружения, так и с самыми высокими его значениями в 2023 г. (Талисман). Таким образом, наличие этих аллелей в генотипе может указывать лишь на вероятность высокой аллергенности его проламинов. Учитывая, что при анализе зерна урожая 2022 г. связи между содержанием глютена и аллелями АКЛ не установлено, можно сделать вывод о том, что процессы биосинтеза и накопления проламинов овсом и в том числе их иммуногенных фракций, контролируются не только непосредственно авенин-кодирующими локусами, но и зависят от физиологических процессов, протекающих в тканях растений и связанных, в том числе, с природно-климатическими факторами. Изучение и понимание этих процессов имеет важнейшее значение для выбора гипоаллергенных генотипов и дальнейшей селекции безглютеновых сортов овса.

Литература

Любимова А. В., Еремин Д. И., Фомина М. Н. Анализ иммунореактивности авенинов сортов овса посевного (*Avena sativa* L.), возделываемых в Западной Сибири // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2023. № 5. С. 75–87.

Identification of Perspective Oat Cultivars with a Minimum Content of Gluten Homologous Peptides / V. Dvořáček, A. Kotrbová-Kozak, J. Kozová-Doležalová [et al.] // Preprints. 2020. DOI 10.20944/preprints202010.0596.v1. URL: https://www.researchgate.net/publication/346476726_Identification_of_Perspective_Oat_Cultivars_with_a_Minimum_Content_of_Gluten_Homologous_Peptides (дата обращения: 25.12.2023).

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ МАКРОВОДОРОСЛЕЙ

Д. И. Мальков, А. Х. Бахтиярова, О. О. Бабич

Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта
Калининград, bakhtiarova.allina@yandex.ru

Бурые водоросли являются уникальным сырьем для получения различных биологически активных веществ [Bioactive potential ... , 2022]. Наибольший интерес представляют полифенолы – соединения, определяющие антиоксидантные свойства бурых водорослей [Antioxidant capacities ... , 2012]. На данный момент большинство представленных в литературе технологий направлены на получение полисахаридов [A review on ... , 2022]. Открытым остается вопрос об оптимальных параметрах извлечения фенольных компонентов из биомассы водорослей. В связи с этим целью ра-

боты стал подбор параметров экстракции фенольных соединений из бурых водорослей *Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum* методом математического планирования.

Для определения оптимальных условий ведения процесса экстракции измельченного сырья проводили различными растворителями (вода, метанол, метанол 70 %, ацетон, ацетон 70 %, этилацетат). Варьировали такие параметры как продолжительность экстракции (от 1 ч до 24 ч) и температура экстракции (от 20 °С до температуры кипения растворителя). Полученные извлечения оценивали по тотальному выходу экстракции, определенному гравиметрически, и общему содержанию фенольных соединений, определенному по методу Фолина-Чокальтеу. Для всех экстрактов была исследована антиоксидантная активность относительно радикалов ABTS, DPPH и восстанавливающая способность при взаимодействии с комплексом Fe³⁺ (FRAP). В качестве стандарта использовался раствор тролокса.

При анализе математической модели, полученной в результате обработки экспериментальных данных, было установлено, что наибольший тотальный выход экстракции *F. vesiculosus* достигается водой при продолжительности процесса 24 ч и температуре кипения растворителя (32,9±3,1 %). А наибольшего извлечения фенольных соединений можно добиться водной экстракцией той же продолжительности, но при комнатной температуре (62,37 мг/г). При экстракции водоросли *A. nodosum* наибольший тотальный выход наблюдался при тех же технологических параметрах, что и для *F. vesiculosus* (29,9±2,1 %). Максимальное извлечение фенольных компонентов из водоросли *A. nodosum* также достигнуто водой при комнатной температуре и продолжительности 24 ч (32,89 мг/г). При анализе уравнений регрессии было установлено, что наибольшее влияние на содержание фенольных компонентов в экстрактах оказывает продолжительность процесса.

Экстракты, содержащие наибольшее количество фенольных веществ, были исследованы на антиоксидантную активность (табл.).

Таблица

Антиоксидантная активность экстрактов *F. vesiculosus* и *A. nodosum*

Экстракт	Антиоксидантная активность, мкмоль-экв тролокса/г		
	ABTS	DPPH	FRAP
<i>F. vesiculosus</i>	192,98	268,30	33,68
<i>A. nodosum</i>	89,69	221,62	17,02

Таким образом в ходе работы были подобраны оптимальные параметры для экстракции фенольных веществ из бурых водорослей видов *Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum*. Определены тотальные выходы и содержание фенольных веществ в полученных экстрактах. Установлена высокая антиоксидантная активность водных экстрактов указанных водорослей, полученных при температуре 20 °С и продолжительности 24 ч, что соотносится с высокой концентрацией общих фенольных соединений в их составе.

Литература

- A review on fucoidan structure, extraction techniques, and its role as an immunomodulatory agent / T. U. Jayawardena [et al.] // *Marine drugs*. 2022. Vol. 20, N 12. Art. 755. DOI: 10.3390/md20120755
- Bioactive potential of brown algae / R. R. Remya [et al.] // *Adsorption Science & Technology*. 2022. Vol. 2022. DOI: 10.1155/2022/8422414
- Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus* / T. Wang, R. Jónsdóttir, H. Liu [et al.] // *Agricultural and food chemistry*. 2012. Vol. 60. P. 5874–5883.

БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ СПОДУМЕНА ДВУМЯ ШТАММАМИ *ASPERGILLUS NIGER*

А. З. Миндубаев¹, С. В. Клементьев¹, М. Ю. Сидоров²,
Э. Л. Гоголашвили³, А. Н. Гостева⁴

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань

²Геологический институт ГИ КНЦ РАН, Апатиты

³Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова
Казанского научного центра РАН, Казань

⁴Институт химии и технологии редких элементов и минерального сырья
им. И. В. Тананаева Кольского научного центра РАН, Апатиты

Одним из важных применений биогеотехнологических разработок является биовыщелачивание – извлечение элементов из руд, при помощи микроорганизмов. Исследуются экстремотолерантные культуры гриба *Aspergillus niger* AM1 ВКМ F-4815D и AM2 ВКМ F-4816D. *A. niger* F-4815D выделен из емкости с кусковым белым фосфором, хранящимся в толще воды. Гриб оказался способен обезвреживать белый и красный фосфор, окисляя его до фосфата [Biological Degradation ... , 2021], а также метаболизировать соединения фосфора и растворять нерастворимые в воде фосфатные соединения, включая трикальцийфосфат [Там же].

A. niger F-4816D – дочерний штамм, возникший при культивировании F-4815D. В настоящее время оба штамма задепонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов. Филогенетическое дерево штаммов показало, что они относятся к кластеру внутри вида, специализирующемуся на солиubilизации фосфатных минералов. Поэтому закономерно возникла идея использовать исследуемые штаммы грибов для выборочного биовыщелачивания элементов из минералов.

Впервые для биовыщелачивания лития применены культуры грибов солиubilизаторов фосфата. Также сравнивались эффективности биовыщелачивания в полноценной культуральной среде, содержащей фосфаты, и в среде без источников фосфора – необходимого для роста микробных культур элемента. Предполагалось, что в условиях нехватки биогенного элемента грибы начнут более интенсивно растворять минерал для извлечения микропримесей фосфатов, и заодно переводить в водорастворимую форму содержащийся в нем литий.

ИК-спектры сподумена соответствуют таковым из литературных источников [Chukanov N. V., Chervonnyi, 2016]. Эти результаты свидетельствуют о том, что исследуемый минерал действительно является сподуменом. Проведенный рентгенофлуоресцентный анализ показал наличие 0,013404 % фосфора (в пересчете на оксид P_2O_5) в составе исследуемого минерала. Исследуемый минерал не был прокален перед началом эксперимента.

Рост аспергиллов наблюдался во всех вариантах культуральных сред, но в полноценной с источником фосфора, как следовало ожидать, намного интенсивнее. Было предположение, что исходная культуральная среда загрязнена фосфатами, однако анализ это не подтвердил. Среда без источников фосфора содержит всего $0,96 \pm 0,13$ мг фосфат-ионов/дм³, эта концентрация на уровне погрешности. Значит, основным источником фосфата для роста служил минерал.

Через 14 сут. культивирования культуры уже достигли стадии воздушного мицелия и сформировали споры.

Определение лития в биомассе грибов и культуральной среде проводили методом пламенно-эмиссионной спектроскопии [ПНД Ф 14.1:2:4.138-98].

Результат биовыщелачивания штаммами *A. niger* F-4815D и F-4816D свидетельствует о следующем. Аспергиллы в представленном исследовании сравнительно эффективно извлекали литий в виде ионов Li^+ из минерала сподумена Ловозёрского месторождения (Мурманская область). Причем, основное количество извлеченного элемента накапливалось в биомассе грибов. Что касается влияния фосфатной подкормки, то результаты получились противоречивыми. Рост в среде без фосфатов положительно сказался на экстракции лития в случае *A. niger* F-4816D, однако в случае с *A. niger* F-4815D зависимость приобретает обратный характер. Возможно, это связано с тем, что дочерний штамм *A. niger* F-4816D имеет более выраженные адаптации к дефициту фосфора и более эффективно извлекает его из минералов по сравнению с родительским штаммом *A. niger* F-4815D.

Результаты исследования позволили сформулировать следующие выводы. Биовыщелачивание действительно является потенциальным методом добычи лития. Штаммы *Aspergillus niger* AM1 ВКМ F-4815D и AM2 ВКМ F-4816D в перспективе могут применяться для биовыщелачивания минералов и концентратов.

Литература

ПНД Ф 14.1:2:4.138-98. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовых концентраций натрия, калия, лития, стронция в пробах питьевых, природных и сточных вод методом пламенно-эмиссионной спектроскопии. М. : ФЦАО, 2017. 22 с.

Biological Degradation of Yellow (White) Phosphorus, a Compound of First Class Hazard / A. Z. Mindubaev, E. V. Babynin, E. K. Bedeeva [et al.] // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2021. Vol. 66, N 8. P. 1239–1244. DOI: 10.1134/S0036023621080155

Chukanov N. V., Chervonnyi A. D. Infrared Spectroscopy of Minerals and Related Compounds // Springer Cham. 2016. 1109 p.

АКТИВНОСТЬ ЛЕКТИНОВ *ASPERGILLUS NIGER*

А. З. Миндубаев¹, С. В. Клементьев¹, А. В. Кобелев¹,
С. Т. Минзанова²

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань

²Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова
ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, a.mindubaev@knc.ru; mindubaev-az@yandex.ru

Нами впервые в мире наблюдался рост микроорганизмов в культуральных средах, содержащих белый фосфор в качестве единственного источника фосфора. В процессе исследований были обнаружены новые штаммы гриба, идентифицированного как черный аспергилл. Источником этих уникальных организмов стала емкость с кусковым белым фосфором, погруженным в толщу воды.

Но для внедрения в практику методов применения штамма необходимо знать его воздействие на окружающую среду и организм животных – степень риска для человека. А токсичность, патогенность и аллергенность микроорганизмов во многом связаны с лектинами – классом гликопротеинов, способных к высокоспецифичному связыванию с молекулами биополимеров.

В данной работе как раз и были начаты эти исследования, в частности исследовалась агглютинация эритроцитов кролика. Но активность лектинов не сводится только к опасности штамма. Лектины могут проявлять специфичность к биополимерам бактерий, вирусов, низших эукариот, раковых клеток. То есть стать ключом к пониманию новых свойств штамма, не связанных с биодegradацией. Штамм может стать основой создания новых лекарственных и ветеринарных препаратов, биопрепаратов для борьбы с вредителями сельского хозяйства. Это направление исследований, безусловно, интересно и имеет практическую значимость.

Следует также иметь в виду, что ряд лектинов выполняет в организмах регуляторные функции. Соответственно, должны влиять на биодegradацию – главный предмет наших исследований. К примеру, выделив спектр лектинов, вырабатываемых аспергиллами в ответ на воздействие белого фосфора и добавляя их в культуральные среды, не содержащие данное вещество, можно искусственно вызвать у культур грибов реакции ответа на присутствие белого фосфора (либо других загрязнителей) в среде. Это будет полезно при промышленном культивировании штаммов и создании микробных (ферментных) препаратов для ликвидации загрязнений.

Для культивирования *Aspergillus niger* AM1 ВКМ F-4815D и AM2 ВКМ F-4816D использовалась среда Сабуру. Исследование на эритроцитах кролика показало, что лектины наших грибов обладают выраженной гемолитической активностью. Это свидетельствует о токсичности для млекопитающих, в том числе людей. Наибольшей активностью обладает культуральная среда, очищенная от взвешенных частиц фугованием. Лектины наших грибов демонстрируют гемолиз до 6–9 рядов лунок, а разрушение клеток хлореллы, покрытых клеточными стенками, до 2 ряда.

В каждом последующем ряду лунок концентрация среды и, соответственно, лектинов, падает вдвое. Полученные результаты можно увидеть в таблице и на рисунке.

Таблица

		Чапека (30–35 дней)		Сабуро (5 дней)		
Типы клеток	Виды	Биомасса	Натив. р	Биомасса	Натив. р	
Клетки	F-4815D	0*	1	0	1	Свежие культуры
<i>Chlorella</i> sp.	F-4816D	1	2	1	2	
Эритроциты	F-4815D	нет#	1	6	8	Заморозка (10 дней)
	F-4816D	нет	1	7	9	

0* – количество лунок в которых наблюдается агглютинация (склеивание) эритроцитов / клеток водорослей. нет# – реакция агглютинация не проводилась. Температура заморозки –16...–18 °С.

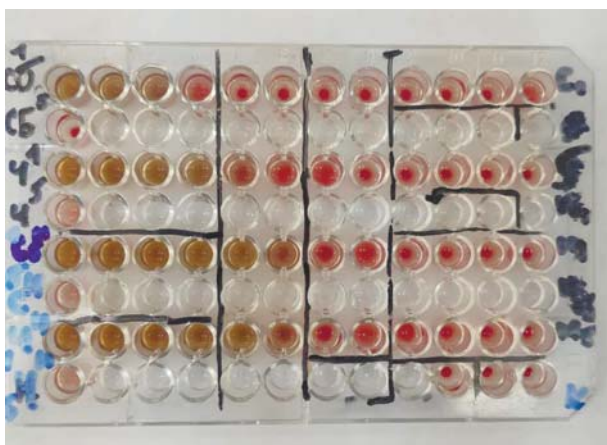


Рис. Гемолиз эритроцитов кролика. Разрушение мембран эритроцитов лектинами приводит к окислению входящего в состав гема железа и изменению окраски с кроваво-красной до бурой

У F-4816D активность лектинов выше, чем у F-4815D. В среде Сабуро активность лектинов через 5 сут. была в 8–9 раз выше, чем в среде Чапека через 30–35 сут. Это связано не только с приростом биомассы, но и, по-видимому, с усилением выработки лектинов. Высокая гемолитическая активность свидетельствует о токсичности для человека. Это может стать помехой в использовании для биодegradации. Зато открывает перспективы создания на основе штаммов лекарственных препаратов (антибактериальных, противогрибковых), сельскохозяйственных препаратов для борьбы с вредителями.

Литература

Активность лектинов *Aspergillus niger* AM1 и AM2 / А. З. Миндубаев, С. В. Клементьев, А. В. Кобелев [и др.]// Бутлеровские сообщения. 2022. Т. 72, № 12. С. 117–129. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/22-72-12-117

КУЛЬТУРЫ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ РАСТЕНИЙ РОДА *WITHANIA* – ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Е. В. Михайлова¹, Р. Р. Гарафутдинов¹, А. А. Слинкин²

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, mikhele@list.ru

²Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

К роду *Withania* (семейство Пасленовые) относятся два ценных лекарственных растения – *W. coagulans* и *W. somnifera*. Листья и корни витании содержат большое количество биологически активных веществ соединений класса витанолидов, у которых обнаружены противоопухолевая, противовоспалительная и антибактериальная активности [Михайлова, 2022]. Плоды *W. coagulans* также содержат аспартильную протеазу, которая используется для коагуляции молока и приготовления сыра [Ahmadi, Salehi, Ausi, 2021]. Растения распространены на территории от Средиземноморья до Восточной Азии, и широко применяются в традиционной медицине, что привело к существенному сокращению природных популяций. Альтернативой является культивирование культур волосовидных корней витании, полученных с использованием *Agrobacterium rhizogenes*. Этот метод также позволяет получать сырье вне зависимости от климатических условий.

Нами было проведено получение и комплексное исследование таких культур корней, а именно оптимальных условий культивирования, экстракции витанолидов и аспартильной протеазы. Показано, что изменение в питательных средах содержания KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 а также солей кобальта не оказывало достоверного положительного влияния на рост волосовидных корней, вопреки данным литературы [Praveen, Murthy, 2013]. Экстракцию витанолидов проводили метанолом, водным метанолом, этанолом, хлороформом, этилацетатом, дистиллированной водой и смесью метанол-хлороформ-вода. Наибольший выход витанолида А и витаферина А наблюдался при использовании водного метанола.

В литературе отсутствуют данные о содержании протеаз в корнях витании. В нашей работе экстракцию ферментов из волосовидных корней проводили с использованием NaCl , KH_2PO_4 и TrisHCl . Была показана способность всех трех экстрактов коагулировать молоко как цельное, так и восстановленное. Наибольшую эффективность показал экстракт TrisHCl .

Таким образом, были выявлены оптимальные условия культивирования волосовидных корней витании и экстракции из них биологически активных веществ, которые могут быть использованы в фармацевтической и пищевой промышленности.

Литература

Михайлова Е. В. Перспективы использования лекарственного растения *Withania somnifera* для производства фармацевтических препаратов биотехнологическим способом // *Biomics*. 2022. Т. 14 (3). С. 192–208. DOI: 10.31301/2221–6197.bmcs.2022–14

Ahmadi S., Salehi M., Ausi S. Kinetic and Thermodynamic Study of Aspartic Protease Extracted from *Withania Coagulans* // *International Dairy Journal*. 2021. Vol. 116. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104960

Praveen N., Murthy H. N. Withanolide A Production from *Withania Somnifera* Hairy Root Cultures with Improved Growth by Altering the Concentrations of Macro Elements and Nitrogen Source in the Medium // *Acta Physiol Plant*. 2013. Vol. 35, N 3. P. 811–816. DOI: 10.1007/s11738–012–1125–5

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ВИРУСОВ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ *IN PLANTA*

Е. В. Михайлова^{1,2}, Э. А. Хуснутдинов¹, М. А. Панфилова^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, mikhele@list.ru

²Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа

Одной из актуальных проблем в геномном редактировании растений является низкий уровень экспрессии элементов CRISPR-системы и низкая эффективность редактирования, которая может быть решена с использованием вирусных векторов [Доступный арсенал систем ... , 2022].

Рекомбинантные вирусы используются в биоинженерии растений с 1990-х годов для различных целей, в том числе сайленсинга генов и транскрипционной экспрессии белков. Преимуществом технологии является то, что целевые, селективные и репортерные гены не встраиваются в геном растения [Mikhaylova, 2023]. Именно это является основным требованием для коммерциализации сельскохозяйственных культур с отредактированным геномом. Во многих странах культивирование сортов, в которых были внесены мутации, которые могли бы появиться естественным путем, не регулируется [Mikhaylova, 2024]. Однако известны лишь единичные случаи, когда такие сорта действительно выходили на рынок.

Это отчасти обусловлено тем, что для большинства сортов сельскохозяйственных культур регенерация из эксплантов *in vitro* представляет большую сложность. Альтернативой может служить использование рекомбинантных вирусов для редактирования *in planta* и получения отредактированных семян. Однако большинство растительных вирусов плохо сохраняется в семенах и практически не передается потомству.

Трансформация *in planta* традиционно применяется для растений семейства Капустных, в том числе арабидопсиса. Нами был поставлен эксперимент по определению эффективности генно-инженерной конструкции для нок-ина гена *bar* на основе геминивирального вектора pTRANS_321 [A multipurpose toolkit ... , 2017] для редактирования генома

A. thaliana, *B. rapa* и *B. napus*. При трансформации методом погружения цветков, активность репортерного гена *GFP* обнаруживалась в семязачатках, а среди потомства имелись растения, демонстрировавшие устойчивость к глюфосинату. Тем не менее низкая эффективность редактирования делает его нецелесообразным при невозможности вести селективный отбор. Таким образом, векторы на основе геминивирусов могут быть усовершенствованы и использованы для бесследного редактирования геномов растений семейства Капустных *in planta*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-76-10065, <https://rscf.ru/project/24-76-10065/>

Литература

Доступный арсенал систем CRISPR/CAS для геномного редактирования растений / Е. В. Михайлова, Э. А. Хуснутдинов, А. В. Чемерис, Б. Р. Кулуев // Физиология растений. 2022. Т. 69, № 1. С. 38–53. DOI: 10.31857/S0015330322010134

A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants / T. Cermák, S. J. Curtin, J. Gil-Humanes [et al.] // The Plant Cell. 2017. Vol. 29, N 6. P. 1196–1217. DOI: 10.1105/tpc.16.00922

Mikhaylova E. V. Crop genome editing—regulations and policies // In Genome Editing and Global Food Security. 2024. P. 212–235. DOI: 10.4324/9781003382102

Mikhaylova E. V. Transgene-free genome editing of plants // Ecological genetics. 2023. Vol. 21. P. 63. DOI: 10.17816/ecogen567964

ВЛИЯНИЕ НИЗКОДОЗОВОГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СИГНАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ И ВЫЗЫВАЕМЫЕ ИМИ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕЗА У РАСТЕНИЙ ТАБАКА

**Ю. А. Немцова, А. В. Иванова, А. А. Печёрина, М. Н. Агеева,
В. А. Воденев, М. А. Гринберг**

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
Нижний Новгород, julnemtcova@yandex.ru

Адаптация растений к изменяющимся условиям окружающей среды и действию стрессоров осуществляется посредством работы сигнальных систем. Один из наиболее быстрых стрессовых сигналов растений основан на сдвигах pH, уровня активных форм кислорода (АФК) и Ca^{2+} [Hilleary, Gilroy, 2018]. Распространяясь из зоны повреждения, такие стрессовые сигналы вызывают изменения в физиологических процессах, в частности, в активности фотосинтеза, что обеспечивает развитие адаптации на уровне всего организма [Sukhov, Sukhova, Vodeneev, 2019]. Повышенный уровень ионизирующего излучения в зоне произрастания растений может модифицировать статус сигнальных систем, что влияет на формирование адаптации и устойчивости к стрессорам [Effect of low-dose ... , 2023]. Механизмы влияния ИИ на сигнальные системы и регулируемые ими фи-

физиологические процессы в растении требуют изучения для понимания специфики формирования адаптации у облученных растений.

В наших исследованиях использовались трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L., трансформированные флуоресцентным рН-чувствительным зондом Pt-GFP и Ca^{2+} -чувствительным биосенсором Case12. Эксперименты проводились на растениях возрастом 6 недель. Для облучения использовался закрытый источник ^{90}Sr - ^{90}Y , являющийся β -излучателем. Активность источника составляла 0,1 МБк, мощность дозы – примерно 31,3 мкГр/ч. Суммарная накопленная доза составляла около 31,55 мГр. Контрольные растения выращивались в аналогичных условиях в отсутствие источника ИИ. Действие стрессора моделировалось нагревом участка листа. В работе использовались следующие методы: внеклеточная регистрация электрической активности; флуоресцентный анализ изменений внутриклеточного рН; регистрация активности фотосинтеза методом РАМ-флуориметрии.

Результаты экспериментов показали усиление стрессовых сигналов и вызываемых ими ответов фотосинтеза у облученных растений:

1. ИИ способствовало меньшему затуханию стрессового электрического сигнала при распространении в соседние листья по сравнению с контрольными.

2. У облученных растений увеличивались амплитуды сдвигов рН и Ca^{2+} , сопровождающих генерацию электрического сигнала.

3. Выявлено увеличение амплитуды ответов фотосинтеза, вызванных электрическим стрессовым сигналом

Работа выполнена при поддержке программы 10 Экспериментальная лабораторная астрофизика и геофизика НЦФМ.

Литература

Effect of low-dose ionizing radiation on spatiotemporal parameters of functional responses induced by electrical signals in tobacco plants / M. Grinberg, Y. Nemtsova, M. Ageyeva [et al.] // Photosynthesis Research. 2023. Vol. 157. P. 119–132.

Hilleary R., Gilroy S. Systemic Signaling in Response to Wounding and Pathogens // Current Opinion in Plant Biology. 2018. Vol. 43. P. 57–62.

Sukhov V. S., Sukhova E., Vodenev V. A. Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants // Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2019. Vol. 146. P. 63–84.

ИЗМЕНЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ТОПОЛЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ГЕНАМИ *HVDH5* И *TAWCS120*

В. В. Павличенко, М. В. Протопопова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, vpavlichenko@gmail.com

Повышение устойчивости растений к повреждающим факторам является важной задачей современной биотехнологии. Среди таких факторов особое значение имеют холод, засуха, засоление и загрязнение тяжелыми металлами. Все эти стрессовые воздействия приводят к потере внутриклеточной воды и, как следствие, к возможной гибели целого организма. В процессе эволюции растения выработали механизмы защиты от дегидратации, которые включают адаптивные изменения как на физиологическом, так и на молекулярном уровне. Основой защиты клеток от обезвоживания является функционирование специализированных белков-дегидринов, которые активно синтезируются в растительных клетках в результате воздействия низких положительных температур, засухи, засоления и загрязнения тяжелыми металлами. За счет высокой гидрофильности дегидрины способствуют защите от обезвоживания и стабилизируют клеточные белки, а также выполняют криопротекторные функции.

Древесные растения, а также продукты их переработки, имеют важное хозяйственное значение. Древесина является сырьем для производства строительных материалов, мебели, спортивного инвентаря, транспортных средств, элементов декора, домашней утвари и других хозяйственных и промышленных изделий. Древесные растения также широко используются для озеленения городов, фиторемедиации загрязненных земель, в ветрозащитных мероприятиях и ландшафтном дизайне. Важным аспектом глубокой переработки древесины является её использование для производства жидкого и твердого биотоплива, которое служит источником тепла и электроэнергии как для промышленных предприятий, так и для частных домовладений. Плоды многих деревьев употребляются в пищу, а продукты их переработки являются компонентами продуктов питания или используются для производства косметических и лекарственных средств. Поэтому разработка устойчивых к повреждающим факторам внешней среды деревьев является важной задачей современной биотехнологии. Согласно литературным данным, одними из наиболее и перспективных для генетической трансформации растений являются нуклеотидные последовательности, кодирующие белки дегидрины из пшеницы мягкой *Triticum aestivum* (WCS120) и ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare* (DHN5).

В качестве объекта генетической трансформации был выбран тополь берлинский (*Populus berolinensis* K. Koch) – гибрид тополя лавроволистного (*P. laurifolia* Ledeb.) и тополя черного (*P. nigra* L.). Тополь берлин-

ский является удобным объектом для изучения эффектов генетической трансформации древесных растений. Данный вид быстро растет в лабораторной культуре, легко размножается срезанием и укоренением верхушечной части растения, а также дает много боковых побегов после срезания апикальной меристемы.

Агробактериальную генетическую трансформацию осуществляли [Pavlichenko, Protoropova, 2024] с использованием бинарных векторных систем на основе плазмиды pBI121, несущих кодирующие последовательности генов *HvDhn5* и *TaWCS120* и содержащих селективный ген неомидин фосфотрансферазы II – *nptII*, определяющий устойчивость к канамицину. В качестве растительных эксплантов для кокультивации с агробактерией использовали сегменты междоузлий (без пазушных почек). Для регенерации и микроклонального размножения тополя использовали твердую питательную среду на основе смеси базовых солей классической среды Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением тиамина (1 мг/л), пиридоксина (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), сахарозы (20 г/л) и агара (7 г/л). Кислотность среды доводили до pH 5,7. Для регенерации трансгенных растений использовали питательную среду с добавлением бензилладенина (0,2 мг/л), тидиазурона (0,02 мг/л), нафтилуксусной кислоты (0,01 мг/л). В результате регенерации на селективной питательной среде, содержащей канамицин (50 мг/л) и цефотаксим (250 мг/л), были получены растения тополя берлинского трансгенные по генам *HvDhn5* и *TaWCS120*. Отсутствие агробактериальной контаминации у растений проверяли инкубацией сегментов листьев на питательной среде YEB без антибиотика. Трансгенез был подтвержден укоренением регенерантов в присутствии канамицина в питательной среде (25, 50, 75 и 100 мг/л) и положительным результатом ПЦР с использованием праймеров, специфичных к генам *nptII*, *HvDhn5* и *TaWCS120*.

Полученные трансгенные растения тополя берлинского не обладали ярко выраженными фенотипическими отличиями от контрольных растений. С полученными трансгенными линиями по генам *HvDhn5* и *TaWCS120* была проведена серия экспериментов по изучению их устойчивости к засолению. Оценку степени устойчивости к засолению проводили по сохранению способности к укоренению трансгенных растений на среде с различными концентрациями хлорида натрия по сравнению с контрольными. В экспериментах использовали по одной трансгенной линии растений по каждому из генов. Для этого в вышеописанную базовую питательную среду МС добавляли индолилмасляную кислоту (0,15 мг/л), а также хлорид натрия в различных концентрациях (0, 25, 50, 75, 100, 125, 150 и 200 мМ). Кислотность всех питательных сред приводили к одинаковому значению pH 5,7. На полученные питательные среды высаживали срезанные апикальные части трансгенных и контрольных растений для укоренения. Концентрация хлорида натрия 25 мМ не вызывала видимых изменений в укоренении и росте как контрольных, так и трансгенных рас-

тений тополя. Хлорид натрия в концентрации 50 мМ угнетал рост как контрольных, так и трансформированных геном *TaWCS120* растений тополя. Эта же концентрация хлорида натрия не оказывала воздействия на растения, трансгенные по *HvDhn5*. Линия тополя, трансгенная по *HvDhn5* и укорененная в присутствии хлорида натрия (50 мМ), фенотипически не отличалась от контрольной группы. Последующее повышение концентрации хлорида натрия в питательной среде до 75 мМ приводило к некрозам листьев в контроле и у линии тополя, трансформированной *TaWCS120*. Напротив, линия тополя, трансформированная *HvDhn5*, демонстрировала устойчивость к хлориду натрия (75 мМ), сохраняя способность нормально вегетировать без некротических проявлений. Дальнейшее повышение концентрации хлорида натрия в питательной среде до 100 мМ приводило к полному подавлению корнеобразования у контрольных растений. При этом все растения обеих трансгенных линий продолжали укореняться при данных значениях засоления. Концентрации хлорида натрия 125 и 150 мМ вызывали полное подавление корнеобразования как в контроле, так и у трансгенных линий. Дальнейшее повышение концентрации хлорида натрия до 200 мМ приводило к гибели контрольных и трансгенных растений.

Результаты экспериментов показали, что генетическая трансформация тополя берлинского генами *TaWCS120* и *HvDhn5* приводит к повышению его устойчивости к засолению хлоридом натрия, при этом эффект генетической трансформации геном *HvDhn5* носит более выраженный характер.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00418, <https://rscf.ru/project/24-24-00418/>).

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за доступ к аналитическому оборудованию.

Литература

Pavlichenko V. V., Protopopova M. V. Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of *Populus x berolinensis* K. Koch // *Methods and protocols*. 2024. Vol. 7, N 1. P. 1–13.

ВЛИЯНИЕ ГОМОЛОГА *LEC1* И ЕГО ПАРТНЕРОВ У *MEDICAGO TRUNCATULA* НА РАЗВИТИЕ СОМАТИЧЕСКИХ ЭМБРИОНОВ

Э. А. Поценковская¹, В. Е. Творогова², А. В. Брынчикова¹,
Л. А. Лутова²

¹Научно-технологический университет «Сириус», Сириус
potsenkovskaya.ea@talantiuspeh.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
krubaza@mail.ru

Соматический эмбриогенез (СЭ) – это способ регенерации, в ходе которого растения формируют из соматических клеток биполярные эмбрионоподобные структуры. Как и обычные эмбрионы, эти структуры способны развиваться в новые растения. СЭ имеет большое значение для биотехнологии растений, где используется для получения искусственных семян, в качестве модели в фундаментальных исследованиях, а так же как способ регенерации растений *in vitro*, используемый не только для микрорепродукции, но и для получения стабильных трансформантов растений. *Medicago truncatula*, модельное бобовое растение, широко используется для изучения СЭ [Iantcheva, Revalska, 2018]. Применение обычных протоколов трансформации растений для большинства зернобобовых затруднено, что объясняется низкой способностью к регенерации [Potential, constraints ... , 2018]. Для инициации или улучшения регенерации с помощью СЭ можно использовать морфогенетические регуляторы. Поиск модификаций, способных повысить способность к регенерации у бобовых, является актуальным направлением исследований.

Транскрипционный фактор *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)*, а также его близкий гомолог *LEC1-LIKE (LIL)*, играют важную роль в регуляции СЭ. Эктопическая экспрессия *LEC1* или его ортологов индуцирует формирование соматических эмбрионов, а специфическая экспрессия этих генов или их ортологов во время СЭ наблюдается у многих видов растений [Arabidopsis *LEC1* and ... , 2019; Arabidopsis *LEAFY* ... , 1998; Identification of putative ... , 2016].

Целью нашей работы было оценить влияние на СЭ ортологов *LEC1* и *LIL* у *M. truncatula*, *MtNF-YB10* и *MtNF-YB3*, соответственно.

В ходе работы мы впервые получили редактированные CRISPR/Cas9 растения эмбрионной линии R108 *M. truncatula* с потерей функции *MtNF-YB10*. Ранее мутанты с потерей функции гена *LEC1* и близких к нему генов были получены только для двух видов – *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* [Rice *LEAFY* ... , 2022; Arabidopsis *LEAFY* ... , 1998; The rice *LEC1-like* ... , 2021]. Показательно, что среди трансформантов T0 были только неотредактированные и гетерозиготные по потере функции растения. Гомозиготные потомки смогли дать фертильное потомство с гомозигот-

ной мутацией. При культивировании мутантов *mtnf-yb10-5-2* в каллусах Т1 было выявлено, что потеря функции *MtNF-YB10* значительно уменьшает способность растений к соматическому эмбриогенезу *in vitro*.

Кроме того, были получены линии со сверхэкспрессией *MtNF-YB10* и оценена способность к СЭ в каллусах Т1. Можно заключить, что сверхэкспрессия гена *MtNF-YB10* в каллусах Т1 в твердой среде увеличивает способность растений к СЭ и каллусогенезу.

Полученные результаты позволяют расширить представление о функциях генов *MtNF-YB10*, *MtNF-YB3* в СЭ.

Литература

Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 Is Sufficient to Induce Embryo Development in Vegetative Cells / T. Lotan, M. Ohto, K. M. Yee [et al.] // Cell. 1998. Vol. 93. P. 1195–1205.

Arabidopsis LEC1 and LEC2 Orthologous Genes Are Key Regulators of Somatic Embryogenesis in Cassava / A. Brand, M. Quimbaya, J. Tohme, P. Chavariaga-Aguirre [et al.] // Front. Plant Sci. 2019. Vol. 10. DOI: 10.3389/fpls.2019.00673

Iantcheva A., Revalska M. Early events during the induction of somatic embryogenesis in genera *Medicago* // Bulg. J. Agric. Sci. 2018. Vol. 24, N 6. P. 1042–1052.

Identification of putative homologs of *Larix decidua* to BABYBOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL-related HOMEBOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK) during somatic embryogenesis / A. Rupps, J. Raschke, M. Rümmler [et al.] // Planta. 2016. Vol. 243. P. 473–488.

Potential, constraints and applications of *in vitro* methods in improving grain legumes / A. Prapat, U. Prajapati, C. M. Singh [et al.] // Plant Breeding. 2018. Vol. 137, N 3. P. 235–249.

Rice LEAFY COTYLEDON1 Hinders Embryo Greening During the Seed Development / F. Guo, P. Zhang, Y. Wu [et al.] // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13. P. 887–980.

The rice LEC1-like transcription factor OsNF-YB9 interacts with SPK, an endosperm-specific sucrose synthase protein kinase, and functions in seed development / Niu B., Zhang Z., Zhang J. [et al.] // Plant J. 2021. Vol. 106. P. 1233–1246.

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И ИНДУКЦИИ ОРГАНОГЕНЕЗА САПОЖНИКОВИИ РАСТОПЫРЕННОЙ

И. Ф. Рахматуллина, Б. Р. Кулуев

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, rakhmif@anrb.ru
Уфимский университет науки и технологий, Уфа

В последние десятилетия во всем мире наблюдается активный рост интереса к терапевтическому потенциалу растений, продолжает увеличиваться и объем мирового рынка лекарственных препаратов растительного происхождения. Активно растущий спрос на качественное лекарственное растительное сырье как у нас в стране, так и за рубежом открывает большие перспективы для развития данной отрасли. Однако для удовлетворения такого спроса требуется огромное количество биологических ресурсов, которые, как известно, ограничены.

Сапожниковия растопыренная (*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk) – многолетнее травянистое растение, обладающее выраженным фармакологическим потенциалом [Kim, Seo, Yun, 2018]. Корни *S. divaricata*, в которых содержатся полифенольные соединения, основными из которых являются хромоны, широко используются в традиционной медицине многих азиатских стран для лечения головной боли, воспалений и артрита [Saposhnikovia divaricata ... , 2017]. В нашей стране в последние годы также ведется интенсивная добыча корней этого растения в Республике Бурятия, Забайкальском крае и Амурской области. В связи с нерациональным использованием сырьевой базы *S. divaricata* возникла угроза критического сокращения природных популяций данного вида. Предпринимаемые меры, в том числе включение *S. divaricata* в списки Красных книг Республики Бурятия, Забайкальского и Приморского краев, остаются недостаточными [Банщикова, Вахнина, Желибо, 2020; Результаты первичной ... , 2021]. В связи с этим актуальными являются исследования, направленные на разработку способов размножения сапожниковии растопыренной в условиях *in vitro*. Целью данной работы является определение оптимальных условий для получения асептической хорошо растущей культуры *in vitro* и индукция органогенеза *S. divaricata*.

Последовательная обработка семян сапожниковии растопыренной 75%-ным этанолом (1 мин) и 10%-ной белизной (5 мин) привело к получению наибольшего числа стерильных проростков (всхожесть – 80 %), которые характеризовались интенсивным ростом. Предварительная стратификация семян при +5 °С в течение 2 недель увеличила всхожесть семян до 86 %. Для индукции органогенеза в качестве эксплантов использовали семядоли, гипокотили и листья *S. divaricata*, которые культивировали на среде Мурасиге – Скуга содержащей регуляторы роста – 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D), индолилуксусную кислоту (ИУК), 6-бензиламинопурин (БАП) и зеатин в различных концентрациях. Семядольные листья оказались наименее способными к органогенезу в исследуемых условиях культивирования. 1 мг/л зеатина в сочетании с 1,5 мг/л ИУК не стимулировал каллусогенез ни на одном из видов эксплантов. Сочетание 1 мг/л 2,4-D и 1,5 мг/л зеатина индуцировало каллусогенез на листовых эксплантах *S. divaricata*. У 65 % эксплантов наблюдалось формирование светло-зеленого каллуса на поверхности листовой пластинки после 3 недель культивирования. Сочетание с 1,5 мг/л БАП и 1 мг/л 2,4-D индуцировало каллусообразование на поверхности гипокотилей (40 %). Дальнейшей регенерации побегов *S. divaricata* в обоих случаях не наблюдалось, поэтому исследования по подбору оптимального состава регуляторов роста продолжаются.

Литература

Банщикова Е. А., Вахнина И. Л., Желибо Т. В. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin в степях Юго-Восточного Забайкалья // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2020. Т. 19, № 1. С. 87–92.

Результаты первичной интродукции *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН / Т. В. Елисафенко, Е. А. Королок, П. Н. Юрина [и др.] // Растительный мир Азиатской России (Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН). 2021. Т. 14, № 4. С. 293–302.

Kim M., Seo K.-S., Yun K. W. Antimicrobial and antioxidant activity of *Saposhnikovia divaricata*, *Peucedanum japonicum* and *Glehnia littoralis* // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018. Vol. 3. P. 560–565.

Saposhnikovia divaricata: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review / J. Kreiner, E. Pang, G. B. Lenon, A. W. H. Yang // Chinese Journal of Natural Medicines. 2017. Vol. 15. P. 255–264.

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ *RUBY* КАК РЕПОРТЕРА В СИСТЕМЕ ТРАНСФОРМАЦИИ *PISUM SATIVUM*

**В. Ю. Симонова¹, Э. А. Поценковская¹, В. Е. Творогова^{1,2},
Л. А. Лутова^{1,2}**

¹Научно-технологический университет «Сириус», Сириус
simonova.vy@talantiuspeh.ru, potsenkovskaya.ea@talantiuspeh.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
krubaza@mail.ru, la.lutova@gmail.com

В системах трансформации растений необходимо присутствие маркера, который позволяет отбирать успешно трансформированные клетки. Для этого совместно с целевым геном доставляется либо ген резистентности к антибиотику (для селекции на питательной среде), либо репортер, который может визуализировать трансгенную ткань. Большинство репортерных систем требуют дорогого оборудования или реактивов. Относительно недавно была создана репортерная система *RUBY*, содержащая набор ферментов, преобразующих аминокислоту тирозин в ярко-красный беталаин [A reporter for ... , 2020]. Данная система позволяет неинвазивно визуализировать трансгенную ткань без дополнительного оборудования и дорогостоящих химических реагентов.

Бобовые, в том числе и горох, восприимчивы к инфицированию агробактериями, но регенерация полноценного растения из трансформированных клеток в лабораторных условиях труднодостижима по сравнению с другими видами. Решением данной проблемы может стать использование регуляторов соматического эмбриогенеза. Для поиска морфогенетических регуляторов необходимо разработать систему, которая позволит получать трансгенные каллусы гороха. Такая система даст возможность трансформировать экспланты гороха различными регуляторными генами и искать ген, который мог бы стимулировать соматический эмбриогенез при сверхэкспрессии в трансгенном каллусе. В рамках данного исследования была изучена эффективность системы *RUBY* для трансформации эксплантов гороха.

Исследование выполнено в рамках гранта РФФ № 24-26-20117

Литература

A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation / Y. He, T. Zhang, H. Sun [et al.] // Horticulture Research. 2020. Vol. 7, N 152. DOI: 10.1038/s41438-020-00390-1

ПОЛЕВАЯ ОЦЕНКА КОЛЛЕКЦИИ ОВСА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КОРОНЧАТОЙ И СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНАМ В УСЛОВИЯХ СЕВЕРНОГО ЗАУРАЛЬЯ

А. К. Таутекенова, Д. И. Ерёмин

Тюменский научный центр СО РАН, НИИСХ СЗ – филиал ТюмНЦ СО РАН
Тюмень, atautekenova@gmail.com

Введение. На территории Северного Зауралья распространены такие ржавчинные болезни овса, как корончатая ржавчина (*Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* Fraser et Led.) и стеблевая ржавчина (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *avenae* Eriks.). Поражение овса вызывает раннее усыхание листьев, что негативно отражается на урожайности и качестве зерна. В отдельные годы потери урожая от стеблевой и корончатой ржавчины могут достигать 40 %, что существенно выше экономического порога вредоносности. Борьба с такими болезнями – крайне затруднительна. Они проявляются лишь во второй половине вегетации овса, когда обработка фунгицидами невозможна. В связи с этим есть необходимость в создании новых сортов, обладающие генетической устойчивостью к данным патогенам.

Цель исследований: поиск перспективных в селекционном отношении генотипов овса, обладающих устойчивостью к корончатой и стеблевой ржавчинам в условиях Северного Зауралья.

Материалы и методы. Исследования проводили на опытном поле НИИСХ Северного Зауралья. Материалом для исследования послужил 31 сорт овса посевного. Материал для исследования предоставлен Федеральным исследовательским Центром Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова. Пораженность растений корончатой ржавчиной определяли глазомерно на флаговом и предфлаговых листьях всех растений, стеблевой – на двух верхних междоузлиях, влагалищ флагового и предфлагового листьев и метелка растений, растущих на делянке по шкале Петерсона с соавторами (1948 г.). Метеорологические условия в годы исследований были разнообразны. Вегетационный период 2022 г. был теплым и умеренно увлажненным. Вторая половина вегетации была благоприятна для развития болезни. В 2023 г. условия вегетации существенно отличались – погода была очень жаркая при отсутствии дождей.

Результаты. Максимальная степень проявления ржавчины на изучаемых генотипах была в 2023 г. Этому способствовало обилие подгона, который значительно отставал в развитии от основного стебля. Интенсив-

ность поражения варьировала от 5 до 70 % у стеблевой; и от 60 до 80 % у корончатой ржавчины. Сорты, имеющие устойчивость к стеблевой ржавчине, составила 13 % от коллекции: AC Goslin (к-15303), AC Francis (к-15302), PC 58 (к-14220), Гибрид (к-15020). Доля сортов, пораженных стеблевой ржавчиной, составила 87 % от коллекции. Минимальная (5 %) степень поражения отмечена у сортов: Ударник У-883 (к-8256), Фома (к-15451), Северянин (к-11132), Скороспелый (к-11717), Нарымский 943 (к-11122), Selma (к-11584), Тюменский голозерный (к-14784), Камбулинский (к-13911), Perona (к-13478), Мегион (к-14039), Напрс (PC 39) (к-15319). Местный сорт Отрада (к-15380) был поражен в максимальной степени – 70 %. Сорты, имеющие устойчивость к корончатой ржавчине, составили 77 % от коллекции: Золотой Дождь (к-7947), Ударник У-883 (к-8256), Фома (к-15451), Талисман (к-14785), Таёжник (к-12245), Орёл (к-8494), Новосибирский 88 (к-14031), Нидар (к-2874), Нарымский 943 (к-11122), Astor (к-11379), Selma (к-11584), Тюменский голозерный (к-14784), Perona (к-13478), Мегион (к-14039), Тоболяк (к-15827); сорта имеющие гены устойчивости: PC 38 (к-12096), Гибрид (к-15020), Гибрид (к-15021), AC Goslin (к-15303), Камбулинский (к-13911), PC 68 (к-14398), AC Francis (к-15302), PC 58 (к-14220), AC Medalion (к-14914). Доля генотипов, которые были поражены корончатой ржавчиной, составила 23 % от коллекции. В минимальной степени поражения (60 %) поражался сорт Отрада (к-15380), тогда как Напрс (PC 39) (к-15319) и Северянин (к-11132) – максимальной степени 80 %. В результате исследования исходного материала, были выделены 4 сорта, обладающие одновременно устойчивостью к стеблевой и корончатой ржавчинам: AC Goslin (к-15303), AC Francis (к-15302), PC 58 (к-14220), Гибрид (к-15020).

Заключение. Таким образом, в ходе полевой оценки коллекции овса в условиях Северного Зауралья выделены генотипы с групповой устойчивостью к стеблевой и корончатой ржавчине: AC Goslin (к-15303), AC Francis (к-15302), PC 58 (к-14220), Гибрид (к-15020). Сорты, обладающие высокой устойчивостью к корончатой ржавчине: Золотой Дождь (к-7947), Ударник У-883 (к-8256), Фома (к-15451), Талисман (к-14785), Таёжник (к-12245), Орёл (к-8494), Новосибирский 88 (к-14031), Нидар (к-2874), Нарымский 943 (к-11122), Astor (к-11379), Selma (к-11584), Тюменский голозерный (к-14784), Perona (к-13478), Мегион (к-14039), Тоболяк (к-15827). Данные сорта рекомендуются для использования в селекционных программах и лабораторных исследованиях по выявлению генов устойчивости.

Работа финансировалась за счёт государственного задания FWRZ - 2024-0004 и при поддержке Западно-Сибирского межрегионального научно-образовательного центра мирового уровня.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕНОВ *SAD*, *ADS*, *FAD*, *FAT* И *KAS*, ИГРАЮЩИХ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ В БИОСИНТЕЗЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПЛОДОВ *HIPPORHAE RHAMNOIDES* L.

А. А. Турба¹, Р. О. Новаковский¹, Ю. А. Зубарев²,
Н. В. Мельникова¹, А. А. Дмитриев¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН
Москва, anastas.turba@gmail.com

² Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
Барнаул, niilisavenko@yandex.ru

Облепиха (*Hipporhae rhamnoides* L.) – древесная масличная культура, плоды которой обладают уникальным составом жиров. В мякоти плодов преобладают пальмитиновая (С 16:0) и пальмитолеиновая (С 16:1) жирные кислоты (ЖК), а в семенах – олеиновая (С 18:1), линолевая (С 18:2) и линоленовая (С 18:3). Известно, что ключевую роль в синтезе этих ЖК играют гены семейств *SAD*, *ADS*, *FAD*, *FAT* и *KAS* [RNA-seq data ... , 2019], поэтому для точечного и целенаправленного улучшения ЖК состава плодов облепихи необходимо провести поиск генов этих семейств в геноме *Hipporhae rhamnoides*.

Поиск исследуемых генов проводили с использованием программы BLASTP с параметрами E-value $\leq 1e^{-10}$, в качестве базы данных использовали последовательности белков *Arabidopsis thaliana* и их ортологи, в качестве запроса использовали белковые последовательности референсного генома облепихи. Геном *Hipporhae rhamnoides*, структурную аннотацию в формате GFF и соответствующие белковые последовательности скачивали из базы данных CNGB Nucleotide Sequence Archive (ID CNP0001846) [Genome of Hipporhae ... , 2022]. В результате обнаружено более 2000 хитов. Для более точного поиска проводили анализ с помощью Скрытой Марковской Модели (HMM) с использованием структурных доменов исследуемых семейств. Дальнейшая проверка с помощью баз данных NCBI-CDD и Pfam подтвердила, что в найденных генах присутствуют все искомые домены. Всего в геноме облепихи нами идентифицировано 9 генов *SAD*, 12 генов *FAD*, 7 генов *FAT* и 7 генов *KAS*. Часть этих генов в результате филогенетического анализа и поиска консервативных мотивов была разделена на подгруппы. Так, в семействе генов *FAD* найдены подсемейства *FAD2*, *FAD3*, *FAD6* и *FAD7*. В семействе *FAT* обнаружены гены *FATA* и *FATB*. Также в семействе *KAS* идентифицированы гены *KAS I* и *KAS II*. Внутри семейств характеристики белков, такие как длина, молекулярная масса и теоретическая изоэлектрическая точка, различались, что может свидетельствовать об их функциональном расхождении.

Найденные гены распределены по всем 12 хромосомам облепихи. Их наибольшее количество расположено на 1 (7 генов), 5 (6 генов) и 11 (9 генов) хромосомах. Наличие дубликации генов проверяли с использованием

приложения MCSanX, и последующую визуализацию полученного результата проводили с помощью программы TBtools. В ходе анализа дупликации генов обнаружены 1 пара тандемной дупликации (*FAD3* (ID 10700 согласно используемому геному облепихи) и *FAD3* (24174)) и 25 пар сегментной дупликации. Дупликации этих генов обнаруживаются во всех 12 хромосомах. Это может указывать на то, что они способствуют расширению семейств генов, вовлеченных в регуляцию состава основных ЖК плодов облепихи. Стоит отметить, что дупликации *FATB* и *KAS II*, а также *SAD* и *FAD3* группируются вместе, что может свидетельствовать о давней совместной дупликации.

Цис-элементы играют важную роль в инициации экспрессии генов, поэтому мы провели анализ в промоторных областях исследуемых генов (2000 н. от стартового кодона) с помощью онлайн программы PlantCARE. Найденные цис-элементы вовлечены в клеточное развитие, выработку фитогормонов, ответ на стрессоры.

Для выяснения того, какие из идентифицированных генов, играют ключевую роль в синтезе ЖК, проведено секвенирование транскриптомов семян и мякоти облепихи сорта Янтарная ягода на 4 ключевых стадиях развития плодов. Секвенирование выполнено на платформе Illumina Nextseq 2000 с длиной прочтений 50 + 50 н. Обработку полученных данных выполняли с помощью программы PPLine [PPLine: an automated ... , 2015]. Оценку дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью программы RTrans (<https://github.com/gskrasnov/RTrans>).

Результаты показали, что большинство генов *SAD* проявляли дифференциальную экспрессию на всех этапах развития плодов облепихи. Экспрессия гена *SAD* (26748) была наибольшей и оказалась тканеспецифичной – высокий уровень отмечен только в мякоти плодов. Известно, что некоторые представители ацил-АПБ-десатураз, к которым относится *SAD*, могут проявлять активность на разных субстратах. Так, в работе Cahoon et al. приводятся данные, в которых ацил-АПБ-десатураза проявляет отчетливую субстратную специфичность к пальмитатному (16:0)-АПБ, а не к стеаратному (18:0)-АПБ [A Determinant of Substrate ... , 1998]. Это может обуславливать повышенное содержание пальмитиновой кислоты в мякоти, однако эти данные требуют дополнительного изучения. Три гена *SAD* (21192, 18803, 18832) вовсе не экспрессировались в ягодах. Также отсутствие экспрессии наблюдалось у обоих найденных генов семейства *ADS*. Более яркую картину экспрессии показали гены семейства *FAD*. Ген *FAD2* (21624) имел наибольший уровень экспрессии как в семенах, так и в мякоти плодов, но на разных стадиях развития. Два из четырех найденных генов *FAD3* (07426, 05528) высоко экспрессировались в семенах, причем только на 2-й стадии развития. При этом в мякоти гены *FAD3* практически не экспрессировались, но была выявлена экспрессия генов *FAD6* (25786) и *FAD7* (02511). Высокий уровень экспрессии генов *FAD2* и *FAD3* в семенах может объяснять повышенное содержание в них олеино-

вой (С 18:1), линолевой (С 18:2) и линоленовой (С 18:3) кислот. Паттерны экспрессии генов *FATA* и *KAS I* в мякоти плодов облепихи были схожи, оба подсемейства экспрессировались на высоком уровне. В семенах картина несколько отличалась, гены *KAS I* и *KAS II* в основном экспрессировались только на первых двух стадиях развития, на среднем уровне. У части генов *FAT* (17924, 24276) и *KAS* (15320, 20437) экспрессия практически отсутствовала.

Полученные в настоящем исследовании данные позволят глубже понять механизмы синтеза ЖК в плодах облепихи и будут способствовать созданию сортов с необходимым ЖК составом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-46-00026, <https://rscf.ru/project/23-46-00026/>.

Литература

A Determinant of Substrate Specificity Predicted from the Acyl-Acyl Carrier Protein Desaturase of Developing Cat's Claw Seed / E. B. Cahoon, S. Shah, J. Shanklin, J. Browse // *Plant Physiology*. 1998. Vol. 117. P. 593–598.

RNA-seq data reveals a coordinated regulation mechanism of multigenes involved in the high accumulation of palmitoleic acid and oil in sea buckthorn berry pulp / J. Ding, C. Ruan, W. Du, Y. Guan // *BMC Plant Biology*. 2019. Vol. 19. P. 1–18.

PPLine: an automated pipeline for SNP, SAP, and splice variant detection in the context of proteogenomics / G. S. Krasnov, A. A. Dmitriev, A. V. Kudryavtseva [et al.] // *Journal of Proteome Research*. 2015. Vol. 14. P. 3729–3737.

Genome of *Hippophae rhamnoides* provides insights into a conserved molecular mechanism in actinorhizal and rhizobial symbioses / Z. Wu, H. Chen, Y. Pan [et al.] // *New Phytologist*. 2022. Vol. 235. P. 276–291.

АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ В ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

**О. А. Федорова¹, Т. А. Гродецкая¹, П. М. Евлаков¹,
А. А. Гусев², О. В. Захарова²**

¹Воронежский государственный лесотехнический университет
им. Г. Ф. Морозова, Воронеж, fed-olga78@mail.ru

²Тамбовский государственный университет им. Г. Р. Державина, Тамбов
nanosecurity@mail.ru

Использование культур растительных клеток является одним из важных методов в биологии растений. Трудности получения асептической культуры в условиях *in vitro* сдерживает широкомасштабное внедрение данной технологии для древесных и кустарниковых растений. Наночастицы, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, а также имеющейся антагонистической активности в отношении многих микроорганизмов приобретают все большую популярность в современном сель-

ском и лесном хозяйствах и биотехнологических приложениях [Дыкман, Щёголев, 2017]. В исследованиях культуры тканей накоплен большой материал, демонстрирующий положительное влияние наночастиц не только на стадии введения в культуру *in vitro*, но и на всех этапах клонального микроразмножения. Проведена серия экспериментов по оценке возможности использования наночастиц оксида меди и серебра в составе питательных сред на разных этапах клонального микроразмножения тополя *Пирамидально-осокового Камышинского (ПОК)*.

Наночастицы оксида меди получали золь-гель методом [Kshirsagar, Shrivastava, Adwani, 2017], наночастицы серебра – методом химического восстановления [Synthesis of silver ... , 2014]. Анализ морфологии полученных наночастиц методом ПЭМ показал, что частицы оксида меди и серебра имеют близкую к сферической форму. Средний размер наночастиц оксида меди составляет 5 – 20 нм, размер частиц серебра находится в диапазоне 10 – 30 нм.

Результаты, проведенных нами исследований, показали, что применение наночастиц оксида меди в составе традиционно используемой для древесных культур среде WPM в концентрациях 5 и 10 мг/л способствует снижению числа инфицированных эксплантов тополя на 25 %. Воздействии наночастиц серебра на число инфицированных эксплантов носит дозозависимый эффект. Так, наибольшее действие наблюдается при внесении в состав питательной среды 10 мг/л наночастиц, число инфицированных эксплантов составляет 10 %, тогда как при внесении 5 мг/л данный показатель повышается до 20 % (контроль 35 %). Снижение числа инфицированности эксплантов тополя на средах с наночастицами оксида меди и серебра может быть связано с антибактериальным и антифунгальным действием растворов используемых наночастиц. Под влиянием различных концентраций наночастиц наиболее активно процессы морфогенеза у эксплантов тополя происходят на средах, содержащих наночастицы в концентрации 5 мг/л – число жизнеспособных эксплантов составляет 70 и 45 % (контроль – 40 %). Увеличение концентрации наночастиц в 2 раза способствует ингибированию развития побега. Таким образом, установлена концентрация наночастиц в составе питательной среды WPM – 5 мг/л, при которой наблюдается положительные эффекты как на снижение инфицированности эксплантов, так и на процессы морфогенеза растения.

В проводимых нами экспериментах по оценке влияния наночастиц на побеги тополя '*Пирамидально-осокового Камышинского*' (ПОК) на этапе мультипликации и ризогенеза в концентрации 5 мг/л не установлено положительного действия на ростовые и регенационные процессы. Результаты показали, что добавление в среду наночастиц оксида меди и серебра на стадии мультипликации растений тополя *in vitro* угнетает ростовые и регенерационные процессы: уменьшается высота стебля растений на 60 и 53 %, число листьев на 7 и 49 %, соответственно. Добавление на-

ночастиц в состав питательной среды также негативно сказывается и на количестве укорененных побегов. Возможно, это связано с токсическим действием наночастиц исследуемых металлов и диктует необходимость подбора других концентраций для ведения данных этапов клонального микроразмножения.

Исследования по влиянию наночастиц на процесс адаптации *in vitro* растений к почвенным условиям показали целесообразность внесения наночастиц оксида меди и серебра в концентрации 5 мг/л в состав почвенного субстрата, используемого для посадки растений. Как показали результаты опытов, при использовании наночастиц оксида меди и серебра 75 и 100 % растений тополя приживаются в условиях оранжереи и имеют более высокие основные показатели роста и развития. Так, у опытных растений под влиянием растворов наночастиц увеличивается высота стебля на 6–12 %, количество листьев – 34–45 %, соответственно, по отношению к контрольным растениям. Положительное действие наночастиц на процесс адаптации растений к оранжерейным условиям и повышение их адаптационных свойств свидетельствует об их способности снижать факторы стресса при переводе растений *ex vitro*. Применение наночастиц способствует также снижению количества инфицированных фитопатогенами растений на 5–10 %. Это объясняется, наличием у исследуемых растворов наночастиц антагонистической активности в отношении основных возбудителей болезней растений, находящихся в стадии покоящихся спор в почве.

Таким образом, анализ результатов применения растворов наночастиц оксида меди и серебра в технологии клонального микроразмножения тополя *Пирамидально-осокового Камышинского (ПОК)* показал возможность их использования в составе питательной среды на стадии введения в культуру *in vitro*, а также в составе почвенного субстрата на стадии перевода в нестерильные условия теплицы.

Литература

Дыкман Л. А., Щёголев С. Ю. Взаимодействие растений с наночастицами благородных металлов (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52, № 1. С. 13–24.

Kshirsagar J., Shrivastava R., Adwani P. Preparation and characterization of copper oxide nanoparticles and determination of enhancement in critical heat flux // Thermal science. 2017. Vol. 21. Art. 233.

Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods / S. Irvani, H. Korbekandi, S. V. Mirmohammadi, B. Zolfaghari // Research in Pharmaceutical sciences. 2014. Vol. 9. P. 385–406.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СОСТАВА СРЕДЫ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЭКСПЛАНТА НА ПРОЦЕССЫ ФОРМИРОВАНИЯ И РАЗВИТИЯ КАЛЛУСОВ У ОЗИМОЙ И ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.

П. А. Федотов^{1,2}, И. В. Любушкина¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, ostrov1873@yandex.ru

²Иркутский государственный университет, Иркутск, pavel.fedotov.17@mail.ru

Культуры клеток и тканей растений широко и эффективно применяются в современной физиологии растений для изучения клеточного ответа на действие факторов внешней среды. Метод каллусных культур зарекомендовал себя как надежный подход к получению стабильной клеточной культуры. Он позволяет в кратчайшие сроки в лабораторных условиях получить изолированную культуру клеток и наблюдать влияние различных факторов на ее развитие. Несмотря на то что во многом успех культивирования зависит от физиологического состояния экспланта, а не особенностей генотипа растения, на практике использование стандартных протоколов при получении каллусных и суспензионных культур зачастую сопряжено с рядом трудностей, обусловленных видо- и сортоспецифичностью, что особенно ярко проявляется у злаков [Зинатуллина, 2023]. Кроме того, у изначально неморфогенных каллусов в дальнейшем может запуститься морфогенез из-за постепенного снижения содержания в среде ауксина как ростового регулятора [Lazzeri, Shewgry, 1993].

В связи с этим целью данной работы было изучение влияния состава среды и концентрации 2,4-дихлорофеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) на формирование и развитие первичных каллусов у озимой (сорт Иркутская) и яровой (сорт Новосибирская 29) мягкой пшеницы.

Экспланты получали из зрелых зародышей пшеницы, которые изолировали из сухих и набухших семян в асептических условиях ламинарного бокса. Семена перед изоляцией зародышей последовательно стерилизовались 1%-ным раствором перманганата калия (KMnO₄) в течение 20 мин и 5%-ным раствором гипохлорита натрия (NaOCl) в течение 30 мин. Экспланты помещались на среды Мурасиге-Скуга (MS), Чу (N₆, содержащую микросоли среды Blaydes), и Гамборга (B₅). В качестве стимулятора роста использовали 2,4-Д в концентрации 2,5 мг/л. Дополнительно готовили среду MS с концентрациями 2,4-Д от 0,5 до 2,5 мг/л с шагом 0,5 мг/л. Через 3 недели проводили учет частоты каллусо- и побегообразования. Также в этот период с интервалом в 1 неделю проводили измерение прироста биомассы каллусов.

Наиболее универсальной средой для получения каллусных культур считается MS в сочетании с 2,4-Д в качестве регулятора роста. 2,4-Д в высокой концентрации способствует пролиферации каллусной ткани и в то

же время ингибирует дифференциацию клеток, что важно учитывать при получении неморфогенных каллусов. В данной работе было важно выявить принципиальные отличия в культивировании каллусной ткани озимой и яровой форм пшеницы на средах MS, B₅ и N₆ и влияние присутствия 2,4-Д в различной концентрации на развитие каллусных культур. Было показано, что первичные каллусы были первоначально рыхлыми, оvoidными, достаточно однородными. Установлено, что частота каллусообразования в культуре зародышей озимой и яровой пшеницы, изолированных из сухих и набухших семян, составила около 70 % на средах MS и N₆, а также B₅ при культивировании сухих зародышей. В культуре зародышей набухших семян на среде B₅ этот показатель составил 40 %, в то время как у яровой пшеницы он превышал 70 %. При использовании среды MS частота каллусообразования не достигала 30 %. Более серьезные различия были обнаружены в скорости прироста биомассы первичных каллусов в зависимости от состава среды. У озимой пшеницы по истечении 3 недель культивирования на среде MS при использовании зародышей сухих семян средняя масса каллуса составляла около 40 мг, тогда как при использовании зародышей, полученных из набухших семян, средняя масса каллуса в этот же период была в 2 раза больше. На среде N₆ средние массы каллусов составляли 25 мг после 1-й недели и 60 мг по истечении 3 недель. Наименее эффективной для выращивания каллусов озимой пшеницы оказалась среда B₅, где прирост биомассы регистрировался лишь в течение первых 2 недель. У яровой пшеницы в культуре зародышей сухих семян небольшие различия в приросте биомассы на средах MS и B₅ были обнаружены по истечении 2 недель, но окончании 3 недели средняя масса каллуса на всех трех средах была примерно одинаковой. При культивировании зародышей яровой пшеницы из набухших семян прирост биомассы на протяжении 3 недель проходил примерно одинаково на всех исследуемых средах, и средняя масса каллуса составляла около 50–60 мг в конце изучаемого периода. Отметим, что при длительном культивировании каллусов на среде B₅ более чем в 50 % случаев происходила спонтанная остановка роста и дальнейшая элиминация каллусов как у озимой, так и у яровой пшеницы.

Дальнейшая работа была направлена на выявление влияния концентрации 2,4-Д на образование неморфогенных каллусов в культуре сухих зародышей. В качестве среды использовали MS как наиболее эффективную для культивирования сухих зародышей. Было установлено, что без 2,4-Д в культуре зародышей яровой пшеницы образования неморфогенных каллусов не происходит. При добавлении гормона наблюдается прямая зависимость между его концентрацией и частотой образования неморфогенных каллусов. Оптимум концентрации 2,4-Д находился в диапазоне от 2 до 2,5 мг/л. В культуре зародышей яровой пшеницы частота образования неморфогенных каллусов составила 65 %. У озимой пшеницы этот показатель был равен 80 %.

Таким образом, состав среды культивирования существенно влиял на скорость прироста биомассы каллусов, особенно при использовании в качестве эксплантов зрелых зародышей, извлеченных из сухих семян, и при длительном культивировании. Наиболее эффективными средами для получения каллусной культуры у яровой и озимой пшеницы являются среды MS и N₆. Среда B₅ не может быть рекомендована для длительного культивирования каллусов озимой и яровой пшеницы в связи с ингибированием прироста биомассы каллусов. Наличие 2,4-Д в культуре сухих зародышей является ключевым фактором для образования неморфогенных каллусов. Наблюдается прямая зависимость между концентрацией 2,4-Д и образованием неморфогенных каллусов на среде MS.

Работа выполнена с использованием коллекций ЦКП «Биоресурсный центр» и оборудования ЦКП «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (Рег. № НИОКТР – 122041100049-0).

Литература

Зинатуллина А. Е. Стадия эмбриогенеза *in planta* влияет на реализацию морфогенетического потенциала зародышей пшеницы *in vitro* // Экобиотех. 2023. № 1. С. 35–44.

Lazzeri P. A., Shewry P. R. Biotechnology of Cereals // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 1993. Vol. 11. P. 122–146.

ИЗУЧЕНИЕ НОВЫХ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКИХ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ

Н. В. Филинова, М. А. Алексеев

ИрИХ СО РАН, Иркутск, filinova_nv@mail.ru

Современным направлением повышения урожайности и качества продукции растениеводства является внедрение в сельскохозяйственное производство энергосберегающих технологий с применением регуляторов роста растений. Регуляция гормонального статуса в онтогенезе путём использования стимуляторов роста является эффективным средством повышения продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам среды. Регуляторы роста позволяют усиливать или ослаблять признаки и свойства растений в пределах нормы реакции, определяемой генотипом.

В качестве потенциальных регуляторов роста растений перспективны соединения с мочевиными и карбаматными структурными элементами.

Это объясняется тем, что такие соединения могут взаимодействовать с рецепторами, предназначенными для связывания с цитокинами – пуриновыми фитогормонами, отвечающими за клеточное деление, дифференциацию клеток и метаболизм белков и полисахаридов.

В ИрИХ СО РАН были созданы гибридные соединения, содержащие остаток молекулы исходного мочевиного фиторегулятора и силатранильную группу. На основании многочисленных литературных данных ожидалось, что введение силатранильной группы приведет к изменению биологической активности исходных соединений.

Таким образом, целью исследования было определение и сравнение биологической активности N,N-диметил-N'-изопропилмочевины (**1**) и N,N-диметил-N'-изопропил-N'-силатранилметилмочевины (**2**) на растениях в контролируемых условиях.

В эксперимент были взяты семена рапса (сорт Jerome KWS) и пшеницы (сорт Джекпот). Протравливание семян исследуемыми соединениями производили в 2х концентрациях: 10 г/т и 20 г/т. Семена высевались в почвогрунт (N₂₀₀P₁₀₀K₃₀₀) с добавлением микроэлементов. Ежедневно осуществляли полив почвы до влажности 60 %. Температуру поддерживали 22–23° С днем и 19–20 °С ночью при 16-часовом фотопериоде. Для растений рапса измеряли длину и массу корней, массу надземной части растения, для растений пшеницы – длину, массу корней и надземной части растения.

Нами было показано, что протравливание семян рапса соединением **1** увеличивало массу проростка и корня, а также длину корня на 10-е сут. после всходов по отношению к контрольному варианту (семена, замоченные в воде) (табл. 1).

Таблица 1

Морфометрические параметры растений рапса при обработке исследуемыми веществами

Вариант	Масса проростка, % к контролю	Соед. 1/соед. 2,%	Масса корня, % к контролю	Соед. 1/соед. 2, %	Средняя длина корня, % к контролю	Соед. 1/соед. 2, %
Контроль корневой системы (10 дней после всходов)						
Контроль	100		100		100	
1 10 г/т	124	100	160	100	129	100
1 20 г/т	118	100	160	100	138	100
2 10 г/т	145	117	196	123	126	97
2 20 г/т	150	130	224	140	138	107
Итоговые результаты (20 дней после всходов)						
Контроль	100		100		100	
1 10 г/т	76	100	100	100	85	100
1 20 г/т	85	100	97	100	85	100
2 10 г/т	71	93	92	92	98	115
2 20 г/т	73	85	103	106	99	116

Обработка семян растворами соединения **2** на начальном этапе роста в большей степени повлияло на исследуемые параметры, чем обработка семян исходным веществом: масса корня была больше, чем в контроле, более чем в 2 раза в концентрации 20 г/т. Сравнение эффекта соединений **1** и **2** свидетельствует о том, что наибольшее воздействие соединение **2** оказало на массу проростка (на 30 % в концентрации 20 г/т) и на массу корня (на 40 % в концентрации 20 г/т).

Протравливание семян пшеницы раствором соединения **1** в концентрации 20 г/т, через 10 дней вегетации после всходов, увеличивало массу корня (на 74 %), массу стебля с листьями (на 24 %) по сравнению с контрольным вариантом, но при этом не влияло на их длину (табл. 2).

Таблица 2

Морфометрические параметры растений пшеницы при обработке исследуемыми веществами

Вариант	Масса корня, % к контр.	Соед. 1/соед. 2, %	Масса стебля, % к контр.	Соед. 1 / соед. 2, %	Длина корня, % к контр.	Соед. 1 / соед. 2, %	Длина стебля, % к контр.	Соед. 1/соед. 2, %
Контроль корневой системы (10 дней после всходов)								
Контроль	100		100		100		100	
1 10 г/т	118	100	102	100	94	100	99	100
1 20 г/т	174	100	124	100	90	100	94	100
2 10 г/т	143	122	129	126	100	106	96	96
2 20 г/т	126	72	113	91	83	91	93	99
Итоговые результаты (20 дней после всходов)								
Контроль	100		100		100		100	
1 10 г/т	109	100	109	100	99	100	95	100
1 20 г/т	128	100	120	100	95	100	100	100
2 10 г/т	103	94	117	108	112	113	96	101
2 20 г/т	100	78	104	87	94	99	104	104

При обработке семян раствором соединения **2** наибольший эффект наблюдался при концентрации 10 г/т: как и в случае с исходным соединением **1** увеличивалась масса надземной (на 29 %) и подземной (на 43 %) части растения пшеницы, но не их длина. При сравнении эффекта соединений **1** и **2** показано, что гибридное соединение **2** влияло сильнее на исследуемые параметры в концентрации 10 г/т (0,001 %), в большей концентрации (0,002 %) наблюдался некоторый ингибирующий эффект.

К концу эксперимента отличия большинства морфометрических признаков были нивелированы, вероятно, это является следствием ограничения роста растений объемом ячейки кассеты.

Таким образом, создание, испытание новых кремнийсодержащих фитогормоноподобных соединений, комплексное изучение их свойств с перспективой применения в агротехнологиях является достаточно актуальной и востребованной задачей в настоящее время.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-23-00278.

БИОТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ МЕХАНИЗМОВ ГИНОГЕНЕЗА И ПАРТЕНОГЕНЕЗА У КУКУРУЗЫ: АНАЛИЗ ГЕНОВ И БЕЛКОВ

М. И. Чумаков, В. В. Фадеев, Ю. В. Фадеева, Е. М. Моисеева

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

В докладе дан анализ генов и белков гиногенеза и партеногенеза кукурузы. При гиногенезе в развитии зародыша участвует только ядро яйцеклетки. При матроклином партеногенезе происходит спонтанное развитие эмбриона и эндосперма без опыления. Для современного сельского хозяйства могут быть созданы технологии на основе гиногенеза (двойные гаплоиды, гаплоиндукторы) и партеногенеза (размножение семенами без опыления), но для этого требуется исследование генов, контролирующих начало спонтанного (без опыления) эмбрио- и эндоспермогенеза у кукурузы.

Саратовскими селекционерами около сорока лет назад были получены гаплоиндуцирующие (ГИ) и партеногенетические линии кукурузы [Одинарное оплодотворение ... , 1997; Тырнов, Еналеева, 1983] у которых автономный эмбриогенез и эндоспермогенез наблюдается в десятки-сотни раз чаще, чем у обычных линий.

Нами показано, что ГИ-линии кукурузы саратовской селекции ЗМС-8 и ЗМСП имели 14 одинаковых однонуклеотидных замен (ОНЗ) и одну четырех-нуклеотидную вставку в гене гиногенеза *MTL/NLD/PLA1*, как и их предок – линия Stock 6 [Анализ мутаций ... , 2023]. В результате этой вставки 3D модель белка *MTL/NLD/PLA1* у ГИ линий имеет 20 α -спиралей, тогда как как у белка референсной линии В73 – 24 α -спирали. Соответственно структура и функция белка фосфолипазы (*PLA1*) нарушается, и мембрана спермия может, вероятно, иметь другой состав и способность к слиянию с мембранами яйцеклетки и образованию гаплоидного зародыша и растения.

Установлено, что ген *GEX2*, контролирующей адгезию мембран гамет кукурузы у ГИ линии ЗМСП имеет высокий полиморфизм: 27 ОНЗ, вставку размером в 9 нуклеотидов и одну двухнуклеотидную замену, по сравнению с линией В73 [Сравнительный анализ ... , 2023]. У белка *GEX2* гаплоиндуцирующей линии кукурузы ЗМС-8 обнаружены 12 аминокислотных замен (АКЗ) и 2 вставки по сравнению с белком референсной линии В73, а у белка гаплоиндуцирующей линии ЗМСП – 11 АКЗ и 2 вставки. Отличия между 3D моделями белков *GEX2* линий В73, ЗМС-8 и ЗМСП наблюдаются во вторичной и третичной структуре. При CRISPR/Cas9-редактировании гена *GEX2* кукурузы РНП-комплексами эффективность на протопластах кукурузы достигает 11 %, в зависимости от соотношения и количества компонентов в РНП-комплексах [Analysis of the effectiveness ... , 2024].

Показано, что белок HAP2/GCS1, обеспечивающий слияние мембран гамет кукурузы, у ГИ линии ЗМСП является высококонсервативным и имеет только одну аминокислотную замену, по сравнению с линиями В73 и КМ.

С помощью программы AlphaFold2 построены 3D модели хромо-моделирующих белков кукурузы CHR106 и HDT104 и проведено сравнение 3D структуры этих белков у линий кукурузы АТ-3, АТ-4 и В73. У белков CHR106 линии АТ-4 и HDT104 линий АТ-3 и АТ-4 обнаружено 5 и 6 АКЗ, соответственно, в неструктурированных участках, но изменений в 3D структурах молекул белков CHR106 линии АТ-4 и HDT104 линий АТ-3 и АТ-4 по сравнению с референсной линией В73 не обнаружено.

Получены данные по полиморфизму генов партеногенеза *FIE1* и *FIE2* кукурузы и построены 3D модели FIE белков. Структурированная часть белка FIE1 линии АТ-1 не имеет значительных отличий, в то время как неструктурированные части имеют отличающиеся ориентацию и конформацию. У линий кукурузы АТ-1 и АТ-4 в белок кодирующей части FIE2 не обнаружено нуклеотидных изменений, а у линии АТ-3 наблюдается 1 ОНЗ в белок кодирующей части. У белка FIE2 аминокислотные последовательности всех трех линий полностью идентичны с референсной последовательностью линии В73.

Экспрессия перенесенного из проса в кукурузу гена (PsASGR-BABY BOOM, (BBM)) BBM вызывает индукцию партеногенеза у кукурузы [Conner, Podio, Ozias-Akins, 2017]. Мы исследовали экспрессию гена BBM в завязях партеногенетической линии кукурузы на 20-й день после опыления, но не обнаружили транскриптов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-26-00101).

Литература

Анализ мутаций у генов гиногенеза и партеногенеза кукурузы / Е. М. Моисеева, В. В. Фадеев, Ю. В. Красова, М. И. Чумаков // Генетика. 2023. Т. 59, № 9. С. 1090–1093. DOI: 10.31857/S0016675823090084

Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы / Н. Х. Еналеева, В. С. Тырнов, Л. П. Селиванова, А. Н. Завалишина // Доклады Академии наук СССР. 1997. Т. 353. С. 405–407.

Сравнительный анализ экспрессии генов HAP2/GCS1, GEX2 у линий кукурузы саратовской селекции / Е. М. Моисеева, Ю. С. Гусев, О. В. Гуторова, М. И. Чумаков // Генетика. 2023. Т. 59, № 3. С. 327–335. DOI: 10.31857/S0016675823030098

Тырнов В. С., Еналеева Н. Х. Автономное развитие зародыша и эндосперма у кукурузы // Доклады Академии наук. 1983. Т. 272. С. 722–725.

Analysis of the effectiveness of CRISPR/CAS9-editing of the GEX2 gene by ribonucleoprotein complexes in maize protoplasts / Е. М. Moiseeva, V. V. Fadeev, Yu. V. Fadeeva [et al.] // Rus. J. Genetics. 2024. Vol. 60, N 6. P. 838–842. DOI: 10.1134/S1022795424700285

Conner J. A., Podio M., Ozias-Akins P. Haploid embryo production in rice and maize induced by PsASGR-BBML transgenes // Plant Reprod. 2017. Vol. 30, N 1. P. 41–52. DOI: 10.1007/s00497-017-0298-x

ПРИРОДНЫЙ ТРАНСГЕН *trolC* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ И СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* L.

Д. Ю. Швец¹, А. Д. Мустафина², Х. Г. Мусин¹, Б. Р. Кулуев^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа

²Уфимский университет науки и технологий, Уфа
shvetsdasha99@yandex.ru

В геноме *Nicotiana tabacum* L. в результате горизонтального переноса генов в природных условиях закрепились гомологи *rol*-генов от *Agrobacterium rhizogenes*. Известно, что один из растительных гомологов, а именно ген *trolC* табака, экспрессируется в молодых листьях и кончиках побегов, подавляется ауксином и индуцируется цитокинином, а также, вероятно, способен оказывать положительное влияние на рост и стрессоустойчивость растений. В результате морфометрического анализа ранее полученных нами трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *trolC* в антисмысловой ориентации под контролем 35S CaMV промотора, было продемонстрировано, что продукт гена участвует в регуляции роста корней, как при нормальных условиях, так и при действии тяжелых металлов и гипотермии. Выявлено, что *trolC* оказывает выраженное влияние на компоненты антиоксидантной системы корней при нормальных условиях и при засолении. На сегодняшний день засоление, засуха и загрязнение почвы тяжелыми металлами являются одной из важных проблем, с которыми сталкиваются при возделывании сельскохозяйственных культур, при этом данные стрессовые факторы оказывают отрицательный эффект прежде всего на рост корней. Поэтому перспективным является поиск новых генов, определяющих повышенную устойчивость и продуктивность растений при действии данных стрессовых факторов. Целью исследования являлось определение роли природного трансгена *trolC* в регуляции роста и стрессоустойчивости растений. В качестве материала использовали 4 линии трансгенных растений табака сорта Petit Havana с конститутивной экспрессией фрагмента гена *trolC* под контролем 35S CaMV промотора в антисмысловой ориентации, в качестве контроля не-трансгенные растения табака сорта Petit Havana линии SR1. Предварительно, семена стерилизовали 70 % этиловым спиртом в течение 1 мин, 15%-ной белизной в течение 8 мин, затем промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой, сажали на чашки Петри со средой Мурасиге-Скуга (МС) и выращивали в камерах роста Binder (Германия) при температуре +25 °С, освещенности около 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) (нормальные условия). 10-дневные проростки с одинаковыми размерами корней пересаживали на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС при нормальных условиях, действии засоления в концентрациях 50 и 100 мМ NaCl, ацетата кадмия в

концентрациях 100, 200 и 400 мкМ, гипотермии (+12 °С). Спустя 10 дней проводили анализ содержания мРНК целевого гена *trolC* методом количественной ОТ-ПЦР, а также анализ компонентов антиоксидантной системы в норме и при кадмиевом стрессе (100 мкМ CdAc). В результате анализа уровня экспрессии было выявлено снижение содержания транскриптов гена *trolC* у нетрансгенных и трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией фрагмента этого гена в антисмысловой ориентации при нормальных условиях и при действии засоления, гипотермии и ацетата кадмия. В условиях кадмиевого стресса уменьшение уровня экспрессии гена *trolC* в трансгенных растениях способствовало снижению активности аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы, каталазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы, уменьшению содержания пролина и перекиси водорода, а также повышению общей антиоксидантной способности и увеличению содержания в клетках общего растворимого белка и водорастворимых сахаров при норме и в некоторых случаях при действии ацетата кадмия. Полученные результаты говорят о перспективности использования гена *trolC* для создания новых сортов и линий растений с улучшенными параметрами роста корней и повышенной стрессоустойчивостью.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ КЕДРОВОГО СТЛАНИКА (*PINUS PUMILA*)

И. С. Шевелева

Сибирский федеральный университет
Красноярск, issheveleva@sfu-kras.ru

Основными факторами, влияющим на индукцию, пролиферацию эмбрионального каллуса и созревание соматических зародышей, являются питательный и гормональный состав среды, температура и влажность роста, субкультурный цикл и генетический фон эмбрионального каллуса.

В качестве объекта исследования были использованы семена кедрового стланика, собранные с деревьев, произрастающих в Иркутской области Бодайбинского района вблизи поселка Артемовского, и Чукотского автономного округа на месторождении Баимка (Песчанка).

Для индукции эмбрионного каллуса из зародышей *P. pumila* использовалась базовая среда DCR [Gupta, Durzan, 1985], ее модификация с различными комбинациями регуляторов роста растений: дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D)/ 1-нафталинуксусная кислота (NAA) и 6-бензиладенин (BAP), среды MS [Murasige, Scooge, 1962] и АИ. Все среды были дополнены мезоинозитом – 100 мг/л, сахарозой 30 г/л и агаром – 7 г/л, среды DCR и АИ дополнены гидролизатом казеина – 500–1000 мг/л, L-глутамином – 500 мг/л. В качестве антиоксидантов в средах DCR и АИ

применяли аскорбиновую кислоту в концентрации 300 мг/л и 400 мг/л соответственно. Перед автоклавированием рН всех питательных сред были доведены до 5,8 с помощью NaOH или HCl. Для пролиферации эмбрионного каллуса использовались те же питательные среды, что и для индукции, но с пониженным содержанием регуляторов роста растений в 2 раза. Культуры помещались в темноту при температуре 24±1 °С. Субкультивирование на свежие питательные среды, описание культур и регистрация частоты каллусообразования проводились каждые 14 дней.

Проведенные исследования показали, что питательные среды MS и AI содержат более низкие концентрации Ca_2^+ и имеют более высокое содержание NH_4^+ и NO_3^- , что негативным образом сказывается на каллусообразовании. Кроме того, данные исследования доказывают положительное влияние L-глутамин на стимулирование активного образования ЭСМ и дальнейшее развитие соматических зародышей. На питательной среде MS, где отсутствует L-глутамин, образование ЭСМ из зиготических зародышей не происходило, формировался неэмбрионный каллус, обладавший низкой пролиферационной способностью, быстро деградировал и спустя 4 месяца культивирования погибал. Культивирование зиготических зародышей на средах DCR и AI содержащих в своем составе L-глутамин, приводило к формированию нормально развитых соматических зародышей.

Также значительное влияние на рост эмбрионально – суспензорной массы оказывают регуляторы роста растений. Обычно хвойный эмбрионный каллус пролиферирует при постоянной концентрации регуляторов роста растений или с уменьшенной концентрацией [Pullman, Vicalo, 2014; *Advances in conifer ...*, 2016]. В средах AI и MS использовался ауксин 2,4-D, в средах DCR- NAA в различных концентрациях.

На среде AI и DCR1 образование каллуса наблюдалось только у 15 % эксплантов, на среде DCR2 частота образования каллуса была около 40 %, на средах DCR3 и DCR4 – 80 и 87 % соответственно. На среде MS образование каллуса было крайне низким и составляло всего 5 % (табл.).

Таблица

Индукция каллусов и формирование эмбрионных культур *Pinus pumila*

Питательная среда	Число эксплантов введенных в культуру, шт.	Первичный отклик (%)	Сохранность каллусов через 6 мес. культивирования (%)	Частота формирования эмбрионных культур
DCR1	200	15	0	0
DCR 2	200	40	15	0
DCR 3	200	80	35	1
DCR 4	200	87	50	2
AI	200	15	10	0
MS	200	5	0	0

Полученные результаты показали, что эмбрионный каллус *P. pumila* может пролиферировать в течение длительного времени при снижении концентрации NAA и ВАР. Использование 2,4-D для *P. pumila* отрицательно сказывалось на поддержании эмбрионного каллуса.

Таким образом, можно заключить, что для успешного соматического эмбриогенеза кедрового стланика чрезвычайно важен состав питательных сред, как минеральный, так и гормональный состав.

Литература

Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000 / K. Klimaszewska, C. Hargreaves, M. A. Lelu-Walter, J. F. Trontin // In vitro embryogenesis in higher plants. 2016. Vol. 59. P. 131–161.

Gupta P. K., Durzan D. J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Reports. 1985. Vol. 4, N 4. P. 177–179.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, N 4. P. 473–497.

Pullman G. S., Bucalo K. Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development // New Forests. 2014. Vol. 45. P. 353–377.

ТЕХНОЛОГИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

А. А. Шенаршеева, Э. В. Сынгеева, Г. П. Ламажапова

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления
Улан-Удэ, anna.shenarsheeva@yandex.ru

Применение растительного сырья в пищевой промышленности как биологически активная добавка набирают все большую популярность. Листья облепихи крушиновидной содержат в себе многообразное количество витаминов, флавоноидов, каротиноидов и дубильных веществ, а также макро- и микроэлементов [Скалий, 2007]. Листья облепихи обладают ярко выраженным противовирусными, противоопухолевым действием, болеутоляющим, наркотическим, жаропонижающим, снижающим кровяное давление, желчегонным и многими другими свойствами [Ибрагимов, Гайтова, 2016]. Так, экстракт из листьев облепихи крушиновидной способен выделить большое содержание полезных веществ для человека в ежедневном употреблении как дополнительный источник важных элементов для организма.

При регулярном включении в рацион экстракта на основе растительного сырья листьев облепихи крушиновидной можно восполнить суточную потребность взрослого человека в витамине С – 50–100 мг/сут.

Экстракт обладает антиоксидантными, противомикробными и противовирусными действиями [Лакнауруд, 2011].

На основе экспериментальных данных, проведенных нами, была разработана примерная технологическая блок-схема (рис.) производства экстракта из листьев облепихи крушиновидной [Шенаршеева, Сынгеева, Ламажапова, 2023].

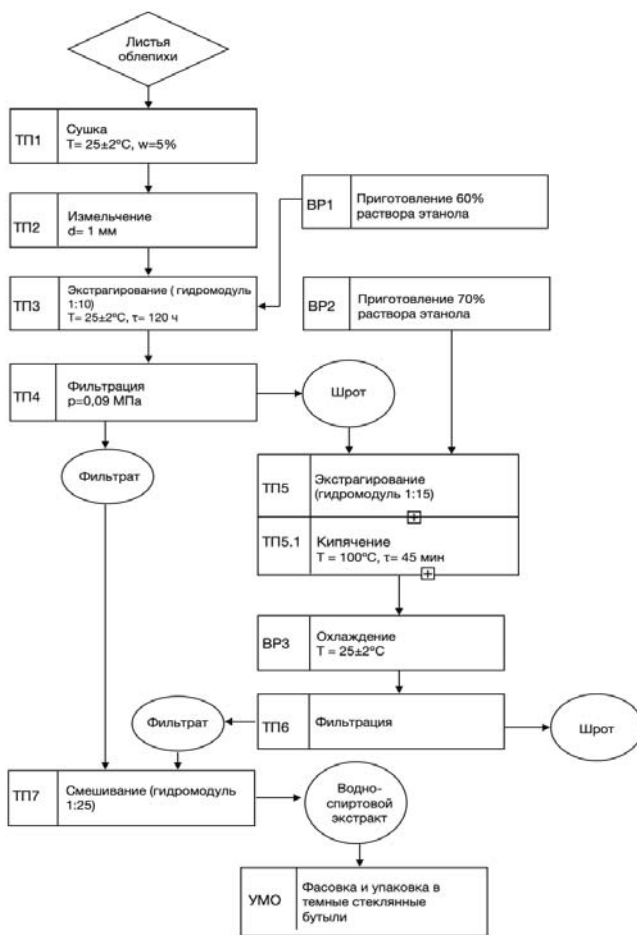


Рис. Технологическая блок-схема производства водно-спиртового экстракта из листьев облепихи крушиновидной

На первом этапе (ТП1) листья облепихи сушат на сушильном столе (1) при комнатной температуре $t = 25 \pm 2$ °C без доступа к солнечному свету до остаточной влажности 5 %. Далее (ТП2) высушенные листья поступают в измельчитель (2) до размера частиц $d = 1$ мм. На вспомогательном процессе (BP1) готовится этиловый спирт с концентрацией 60 %. Следу-

ющим этапом является (ТПЗ) экстрагирование (гидромуль 1:10). Высушенные листья облепихи заливали водно-спиртовой смесью с концентрацией этанола 60 % и экстрагировали в экстракторе (3) в течение десяти дней при комнатной температуре. На процессе фильтрация (ТП4) полученный экстракт отправляется в барабанный вакуум-фильтр (4). Фильтрат направляют на смешивание, а шрот (5) повторно экстрагируют. Экстрагирование (ТП5) производится на оставшемся шроте 70 % водно-спиртовым раствором в соотношении 1:15. (ТП5.1) Экстракт с 70%-ным водно-спиртовым раствором кипятят на ротационном испарителе (7) с обратным холодильником в течение 45 мин, температура кипения 100 °С. После кипячения экстракт охлаждают до комнатной температуры в пластинчатом теплообменнике (8) (ВРЗ). (ТП6) Охлажденный экстракт фильтруют в барабанном вакуум-фильтре (9). Фильтрат направляют на смешивание, а оставшийся шрот собирается в сборнике (10) для дальнейшего использования в кормовые добавки. (ТП7) Фильтрат с первого экстрагирования и со второго смешиваются в коническом смесителе (11).

УМО Фасовка и упаковка. Водно-спиртовой экстракт разливается в бутыль БВ-1-1000 стеклянная темного янтарного цвета по, ГОСТ Р 51477-99. Хранят при $t = 22 \pm 3$ °С в защищенном от света месте.

По представленной блок-схеме производства водно-спиртового экстракта из листьев облепихи крушиновидной возможно получить продукт с наибольшим содержанием биологически активных веществ.

Литература

- Ибрагимов З. Р. Гайтова Т. Р. Листья облепихи как источник БАВ // Актуальные проблемы химии, биологии и биотехнологии. 2016. С. 323–325.
- Лакнауруод, Тимарпур, Дели. Лекарственный и терапевтический потенциал // Журнал этнофармакологии. 2011. № 138. С. 268–278.
- Скалий Л. П. Облепиха : пособие для садоводов-любителей. М. : Ниола-Пресс, 2007. 240 с.
- Шенаршеева А. А., Сынгеева Э. В., Ламажапова Г. П. Получение экстракта из листьев облепихи крушиновидной // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы современной науки, достижения и инновации : сб. науч. ст. по материалам XIII Междунар. науч. -практ. конф., 15 дек. Уфа : НИЦ Вестник науки, 2023. В 3 ч. Ч. 1. С. 193–198. URL: <https://perviy-vestnik.ru/archive-konferentsiya-2023/> (дата обращения 10.01.2024).

Секция 2
ГЕНЕТИКА, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ

ВЛИЯНИЕ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ НА МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК
ШТАММА *GLUTAMICIBACTER* SP. SMB32

Л. Н. Ананьина¹, А. А. Горбунов², Е. А. Шестакова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, ludaananyina@mail.ru, shestakova.e@iegm.ru

²Институт технической химии УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН
Пермь, agorbunof@mail.ru

Представители рода *Glutamicibacter* являются гетеротрофными бактериями, не требующими особых условий для роста. Большинство из них мезофилы с оптимумом роста ниже 30°C [Busse, Wieser, 2014]. Отдельные представители рода *Glutamicibacter* способны выдерживать до 13 % NaCl [*Glutamicibacter halophytocola* ... , 2017]. Известно, что в условиях гиперосмотического стресса в клетках бактерий происходят различные молекулярные и метаболические перестройки [Metabolic rearrangements ... , 2020]. Целью настоящего исследования явилось изучение количеств метаболитов в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32, культивированных при разной солености среды.

Влияние солености среды на центральный метаболизм штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 изучали с помощью метода протонного магнитного резонанса (ПМР). ПМР-спектры экстрактов из клеток исследованного штамма содержали сигналы веществ центрального метаболизма – сукцината, аденозинтрифосфата и аденозиндифосфата. Установлено, что увеличение солености среды с 0 до 8 % хлорида натрия провоцировало снижение уровня сукцината в клетках штамма на 50 %. При этом суммарное количество аденозинполифосфатов уменьшилось на 25 %. Дополнительно оценили изменение внутриклеточного количества таких аминокислот как аланин и валин, поскольку эти вещества синтезируются при избытке восстановленных форм кофакторов реакции их синтеза – никотинамидадениндинуклеотида и никотинамидадениндинуклеотидфосфата. С увеличением солености среды культивирования внутриклеточное количество аланина и валина снизилось на 50 %.

Таким образом, установлено влияние солености среды культивирования на метаболизм клеток штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32.

Настоящее исследование выполнено в рамках государственного задания 124020500028-4.

Литература

- Busse H. J., Wieser M. F. The Genus *Arthrobacter* // The Prokaryotes / eds. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt. Berlin : Springer, 2014. P. 105–132
- Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense* / W. W. Feng, T. T. Wang, J.-L. Bai [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. Vol. 67. P. 1120–1125.
- Metabolic rearrangements causing elevated proline and polyhydroxybutyrate accumulation during the osmotic adaptation response of *Bacillus megaterium* / T. Godard, D. Zühlke, G. Richter [et al.] // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. Vol. 21. P. 8–47.

ПЦР-СКРИНИНГ БАКТЕРИЙ РОДА *STREPTOMYCES* ДЛЯ ЦЕЛЕЙ АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ

А. В. Бакулина, Е. А. Бессолицина, И. Г. Широких

ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока, Киров, mol-biol@fanc-sv.ru

Способность стрептомицетов вступать в ассоциации с растениями, при этом стимулируя их рост и защищая от патогенов, привлекает внимание исследователей по всему миру [Sousa, Olivares, 2016] с целью использования потенциала этих бактерий для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Для агrobiотехнологии ценным свойством является также продукция стрептомицетами экзогидролаз, участвующих в процессах разложения растительных остатков, прежде всего, целлюлозы и лигнина.

В связи с тем, что в условиях *in vitro* синтез стрептомицетами вторичных метаболитов часто подавлен, а продукция ферментов зависит от условий культивирования, преимущество для скрининга штаммов-продуцентов приобретают молекулярно-генетические методы анализа. Исследование с помощью ПЦР стрептомицетных геномов на наличие генов, связанных с синтезом целевых продуктов, позволяет быстро выявить потенциально ценные штаммы.

В работе исследовали 49 штаммов рода *Streptomyces*, выделенных ранее из дерново-подзолистых и серых лесных почв и сопряженных с ними субстратов. Суммарные нуклеиновые кислоты выделяли согласно методике [Sambrook, Fritch, Maniatis, 1983] из культур, выращенных в жидкой среде Гаузе 1. Для выявления интересующих генов применяли метод ПЦР с использованием специфических пар праймеров, синтезированных компанией «Синтол». Для выявления у стрептомицетов генов, связанных с биоконтрольными функциями (поликетидсинтаз типа II (PKS II), хитиназ (*chiC*, *chiA*) и хитинсвязывающего белка (ChiBP)), были разработаны следующие пары праймеров (таб.).

Таблица

Последовательности праймеров, использованных для выявления генов, кодирующих ферменты, связанные с биоконтрольными свойствами стрептомицетов

Мишени	Праймеры	Структура праймера, 5'-3'	ПЦР-продукт, п. н.
PKS типа II	PKSIIF1	f GC(C/G)TGCTTCGA(C/T)GC(C/G)ATC'	414
	PKSIIR1	r CAT(C/G)GA(C/T)TTGAT(G/C)GAGCTGA	
	PKSIIF2	f CCACATGAC(C/G)GG(A/T/C)CTGCG	220
	PKSIIR2	r GTCGTTCTGC(T/C)(T/G)GGTGCC	
	PKSIIF3	f ACCCGCAACGGCTTCGTCC	115
	PKSIIR3	r CGACTTGATGGAGCTGACGG	
Хитиназы (<i>chiA</i> , <i>chiC</i>)	Chit 1F	CCAGCC(G/C)CTGCGCGGCAACTCAACC	600
	Chit 1R	CAGCCGCG(C/G)CCGTAGAAGCCGATGC	
	ChitCF2	CTACTTCACCAACTGGGGCGT(C/G)TACG	244
	ChitCR2	CAGCTTGCG(G/C)AGCTGGTTGAAGTTGC	
Хитин связы- вающий бе- лок (ChiBP)	ChitBPF	GGGAGCCGCAGAGCGT(G/C)GAGGGC	300
	ChitBPR	GTAGGGCAC(G/C)GTCAGGAACGGGGTG	

Для детекции у стрептомицетов генов, кодирующих ферменты, участвующие в разложении целлюлозы (эндоглюканазы семейства GH74) и лигнина (лактазы, марганец- и лигнин пероксидазы) применяли праймеры, приведенные в работах [Выявление генов ... , 2024] и [Шевченко, Бессолицына, Дармов, 2013] соответственно.

Реакцию амплификации проводили на программируемом термостате ТП4-ПЦР-01 «Терцик» («НПО ДНК-Технология», Россия). ПЦР-продукты разделяли методом гель-электрофореза в агарозном и полиакриламидном гелях.

Согласно ПЦР анализу, целевые фрагменты генов PKS типа II обнаруживались преимущественно у штаммов стрептомицетов с уже установленной антагонистической активностью. Ампликон размером 414 п. н. при амплификации с парой праймеров PKSIIF1/PKSIIR1 был обнаружен у штаммов *Streptomyces* sp. T1-3, 8-6, K8-11, K8-16, K8-9, П13-9, П13-16, Н13-4, Н13-7, Н13-9, Н16-6, Н27-12. При использовании праймеров PKSIIF2/PKSIIR2 целевой ампликон (220 п. н.) был выявлен у 18 штаммов. При амплификации с праймерами PKSIIF3/PKSIIR3 целевой ПЦР-продукт (115 п. н.) выявлен у четырех штаммов (*Streptomyces* sp. T3-1, П11-10, П14-8, Н27-12). Штаммы *Streptomyces* sp. 8-6, T3-1, K8-16, П13-9, Н13-4, Н13-7, Н27-12 характеризовались наличием двух фрагментов указанного гена каждый.

Поиск генов хитиназ в геномах стрептомицетов подтвердил наличие гена *chiA* у 73,5 % и гена *chiC* – у 89,8 % исследуемых штаммов. При этом на электрофореграммах заметны различия по интенсивности флуоресценции «полос» в геле при одинаковом количестве ДНК-матрицы, что требует количественной оценки амплификации генов хитиназ. При амплифика-

ции с праймерами к гену, кодирующему ChiBP, установлено, что целевой ампликон (300 п. н.) присутствует в геноме 16 (32,7 %) штаммов.

Наличие фрагментов генов целлюлаз семейства GH74 было установлено с использованием пары праймеров GH74F1/GH74R1 (ампликон 890 п. н.) у 9 штаммов стрептомицетов; у 33 штаммов выявлен ампликон (216 п. н.) при амплификации с парой праймеров GH74F2/GH74R2.

Фрагмент гена лакказы (130 п. н.) выявлен только у трех штаммов *Streptomyces* sp. 8A13, T2-25, H16-6, фрагмент гена лигнинпероксидазы (207 п. н.) был детектирован у 10 штаммов, фрагмент гена марганец пероксидазы (450 п. н.) – у 11 штаммов. Среди исследованных стрептомицетов наибольший интерес вызывает штамм H16-6, у которого были обнаружены три гена лигнолитического комплекса, а также стрептомицеты из ризосферы левзеи сафлоровидной 2ls7, 4ls6, 4ls1, 4ls2, у которых выявлены гены марганец- и лигнинпероксидазы, а также *Streptomyces* sp. T2-25 с генами лакказы и лигнинпероксидазы.

Данные полученные в ходе ПЦР-скрининга, таким образом, позволяют не только выявить агробиотехнологически ценные штаммы стрептомицетов для их дальнейшего изучения, но и послужат основой для создания ассоциаций стрептомицетов, которые различаются по механизмам, лежащим в основе их биоконтрольных свойств, и составу ферментативных комплексов гидролитических ферментов.

Литература

Выявление генов целлюлаз и генов лигнолитического комплекса у штаммов рода *Streptomyces* / А. В. Бакулина, Е. А. Бессолицина, И. А. Лундовских, Е. В. Товстик // Экология родного края: проблемы и пути их решения : материалы Междунар. науч.-практ. конф. Кн. 2. Киров, 2024. С. 106–110.

Шевченко Е. А., Бессолицина Е. А., Дармов И. В. Выявление генов, кодирующих лигнолитические ферменты, у природных изолятов базидиомицетов // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49, № 3. С. 285–285.

Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983. 545 p.

Sousa J. A. J., Olivares F. L. Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. 2016. Vol. 3. P. 1–12.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СОСТАВ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ АКТИНОБАКТЕРИЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Ю. В. Батаева¹, Л. Н. Григорян²

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии
Роспотребнадзора, Оболенск, aveatab@mail.ru

²Астраханский государственный университет им. В. Н. Татищева, Астрахань

В результате проведенных исследований из почвенных экосистем Астраханской области выделены биотехнологически важные штаммы актинобактерий *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 (SCPM-O-B-9993), *Nocardioopsis umidischolae* RCAM04882, *Nocardioopsis umidischolae* RCAM04883 и цианобактерий *Anabaena constricta* IPPASB-2020, обладающие фитостимулирующими, фунгицидными, противовирусными, инсектоакарицидными свойствами [Биологическая активность ... , 2023]. Штаммы депонированы в международные коллекции: НУ ВНИИСХМ, ГКПМ-Оболенск, IPPAS, GenBank NCBI.

Изучение состава метаболитов данных штаммов бактерий показало присутствие разнообразных химических соединений, относящихся к алкалоидам, флавоноидам, терпенам и другим группам. Исследование водно-спиртовых экстрактов (80/20, 20/80) культуры *Anabaena constricta* IPPAS B-2020 методом ВЭЖХ показало наличие изолимонной, молочной, уксусной органических кислот, которые являются активными противомикробными и антиоксидантными агентами. В составе вторичных метаболитов штамма IPPAS B-2020 методом хромато-масс-спектрометрии обнаружили 61 низкомолекулярное соединение. В наибольшей концентрации присутствовал (4R)-1-метил-4-проп-1-ен-2-илциклогексен (D-Лимонен) (11,23 %). Обнаружены также α -пинен, сквален, бензойная кислота, трибутилфосфат, алканы.

В составе метаболитов трех штаммов актинобактерий *N. umidischolae* RCAM04882, *N. umidischolae* RCAM04883 и *S. carpaticus* RCAM04697 обнаружили флавоноиды, алкалоиды, гликозиды, органические кислоты (изолимонную, уксусную, фумаровую, молочную, пировиноградную, яблочную). Состав вторичных метаболитов штамма *S. carpaticus* RCAM04697 включал спирты, альдегиды, углеводороды, эфиры, сульфаты, в том числе 3-бутенилпентиловый эфир и 1,2-гександиол, и другие группы низкомолекулярных органических соединений [Изучение метаболитов ... , 2021].

Разработаны технологии получения экспериментальных образцов биопрепаратов на основе исследуемых штаммов, которые прошли лабораторные и полевые испытания на томатах, перце, картофеле, хлопчатнике.

Для получения биомассы цианобактерии *A. constricta* IPPASB-2020 культивировали в вихревом биореакторе (БИОК-022) при температуре 28 °С в течение 5 сут. при 60 об/мин с люминесцентной лампой

(4000 кельвин). Посевной материал вносили в количестве 20 % от ее общего объема. За это время происходило максимальное наращивание биомассы – 47 мг/м²/ч сухого вещества. Полученную биомассу высушивали в термостате при температуре 37 °С до постоянного веса и измельчали. Для обработки семян и растений использовали суспензию, полученную путем разведения сухой биомассы в воде. *Результатом от использования цианобактерий является увеличение всхожести семян, повышение энергии роста и урожайности растений, защита от фитопатогенов в условиях аридного климата.*

Комплексную схему изготовления экспериментальных образцов биопрепаратов на основе актинобактерий можно представить следующим образом: штаммы RCAM04882, RCAM04883 и RCAM04697 (SCPM-O-B-9993) (каждый по отдельности) выращивали в вихревом биореакторе (БИОК-022) на картофельной среде (рН = 7,0) при температуре плюс 28 °С в течение 72 ч при равномерном перемешивании и постоянной аэрации. Далее в полученные суспензии (живые клетки, споры и продукты метаболизма) с титром клеток 10⁹ КОЕ/мл в качестве загустителя добавляли карбоксиметилцеллюлозу в количестве 1 %. Схема получения экспериментальных образцов на основе штаммов актинобактерий позволяет получать бактериальные препараты в любой микробиологической лаборатории при минимальных производственных затратах.

Таким образом, исследуемые цианобактерии и образуемые ими сообщества и штаммы актинобактерий синтезируют соединения с высокой биологической активностью и могут быть использованы в качестве основы для создания биопрепаратов, удобрений, биологических средств защиты растений.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Литература

Биологическая активность и состав метаболитов штамма *Streptomyces carpaticus* K-11 RCAM04697 (SCPM-O-B-9993), перспективного для использования в растениеводстве / Ю. В. Батаева, Л. Н. Григорян, А. Г. Богун [и др.] // Микробиология. 2023. Т. 92, № 3. С. 318–328.

Изучение метаболитов *Streptomyces carpaticus* RCAM04697 для создания экологически безопасных средств защиты растений / Ю. В. Батаева, Л. Н. Григорян, Е. А. Курашов [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 172–178.

ТЕХНОЛОГИЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИЦЕЛИЯ ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Д. С. Белоусов, Ю. А. Малков, Л. А. Беловежец

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН
Иркутск, belousov_off@mail.ru

Экологическое загрязнение от производственных предприятий представляет серьезную проблему современности. Неконтролируемое использование природных ресурсов приводит к серьезным последствиям для окружающей среды и здоровья людей. В частности, лесопромышленными комплексами и деревоперерабатывающими комбинатами России ежегодно образуется свыше 22 млн м³ древесных отходов [FAOSTAT, 2024]. Последние создают высокий уровень негативного воздействия за счет выделения фенолов и кислот в почву и грунтовые воды; высокой пожароопасности в следствии самовозгорания. Таким образом, утилизация отходов лесопиления является одной из важных экологических задач.

Набирающим обороты в последнее время направлением по утилизации и обезвреживанию древесных отходов является развитие биотехнологии аэробного и анаэробного биотермического компостирования. Данная технология позволяет перерабатывать отходы органического происхождения в экологически чистое, эффективное удобрение (биогумус, компост), тем самым решая проблему загрязнения окружающей среды.

Одними из наиболее активных деструкторов древесины являются различные виды грибов, которые способны расщеплять биополимеры до простых сахаров или жирных кислот. Наибольший практический интерес представляют грибы белой гнили, способные избирательно делигнифицировать древесину до 98 %. Большинство этих грибов – высшие базидиомицеты – *Phanerochaete chrysosporium* (*Sporotrichum pulverulentum*), *Trametes versicolor*, способные разлагать все компоненты растительной массы, что обусловлено синтезом ими большого набора гидролитических и окислительных ферментов, а также высокой проникающей способностью мицелия в субстрат [Прикладная экобиотехнология ... , 2017].

В связи с большим количеством неиспользуемых древесных отходов требуется соизмеримое количество биомассы высших базидиальных грибов. Сотрудниками Иркутского института химии им. А. Е. Фаворского СО РАН совместно с НОЦ «Байкал» была создана установка периодического глубинного культивирования мицелия базидиальных грибов (рис.).

Глубинное культивирование осуществляется в ферментационном аппарате 100 л с рабочим объемом 70 л на питательной среде следующего состава: глюкоза (декстроза) – 18–20 г/л, дрожжевой автолизат – 9,5–10,0 г/л, вода водопроводная – остальное, в течение 6–7 сут. Питательную среду инокулируют маточной культурой, выращенной на жидкой питательной среде аналогичного состава, в количестве 10 % по объему. Тем-

пература процесса культивирования 26–37°C (в зависимости от штамма гриба), pH 4,2–5,6, линейная скорость перемешивающего устройства от 0,3 до 0,5 м/с. В процессе ферментации поддерживается ступенчатая аэрация питательной среды стерильным воздухом. В период лаг-фазы расход воздуха составляет 0,3 л/л/мин, в фазе экспоненциального роста – 0,5–1,0 л/л/мин, в стационарной фазе роста – 1,0–1,5 л/л/мин [Пат. № 2821927, 2024]. Такая аэрация обеспечивает контроль над образованием пены и уменьшает энергетические затраты.

На данный момент установка позволяет получать до 1000 г абсолютно сухого мицелия грибов в месяц, что достаточно для микробиологической переработки 1000–1200 м³ опилок.



Рис. Установка периодического глубинного культивирования мицелия базидиальных грибов

Литература

Пат. № 2821927 Рос. Федерация, МПК C12N 1/14 (2006.01). Способ периодического глубинного культивирования мицелия базидиальных грибов : № 2024111672 : заявл. 27.04.2024 : опубл. 27.06.2024 / Д. С. Белоусов, Ю. А. Малков, Л. А. Беловежец, Д. О. Самульцев. 6 с.

Прикладная экобиотехнология : учеб. пособие. В 2 т. Т. 1 / А. Е. Кузнецов, Н. Б. Градова, С. В. Лушников [и др.]. 2-е изд. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. 629 с.

FAOSTAT. URL: <https://www.fao.org/faostat/ru/#data/FO> (дата обращения: 10.06.24).

АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ ПОЧВЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОРОСЛОЙ

**Д. В. Большакова, А. М. Максимова, М. Н. Мандрик-Литвинкович,
Т. Л. Степанова, Т. А. Пилипчук, Э. И. Коломиец**

ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Республика Беларусь
bolshakova.d96@gmail.com

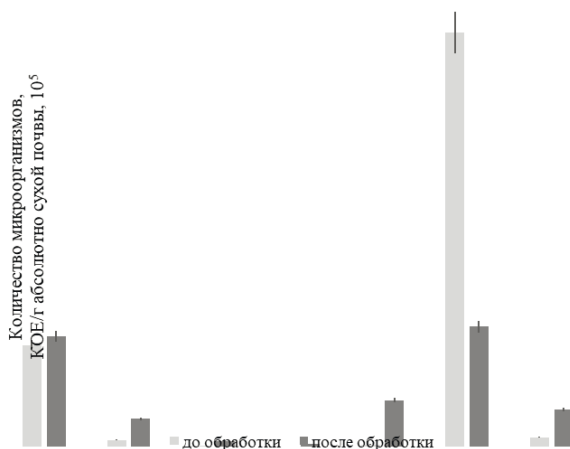
Микроорганизмы почвы принимают участие в круговороте азота, углерода и других элементов; обеспечивают растения питательными веществами, предотвращают заражение фитопатогенами, повышают иммунитет и стрессоустойчивость [Effects of Soil ... , 2022; Comparison and interpretation ... , 2021]. Однако различные антропогенные факторы оказывают существенное влияние на их качественный и количественный состав, приводя к нарушению равновесия в экосистеме, снижая численность полезной микробиоты и повышая долю фитопатогенов и токсинообразующих грибов. Изучение состава и функционирования микробиома почвы может открыть новые возможности для рационального использования полезных взаимодействий микроорганизмов и растений в современном сельском хозяйстве [A review on the ... , 2019].

Особенно актуален данный вопрос при выращивании голубики высокорослой, которая нуждается в кислых почвах (pH 3,5–4,5) с высоким содержанием гумуса (не менее 3 %), хорошим дренажем. Изучение микробного сообщества данной культуры будет являться основой разработки экологических способов ее оздоровления, повышения стрессоустойчивости и продуктивности.

Целью данной работы являлся анализ численности основных функциональных групп микроорганизмов в образцах почвы, отобранных в различных регионах Республики Беларусь в местах произрастания голубики высокорослой.

В ходе проведенных исследований выявлено, что во всех исследуемых образцах преобладали аммонификаторы ($1,1 \cdot 10^6$ – $7,2 \cdot 10^6$ КОЕ/г). Количество амилोलитиков (микроорганизмов, потребляющих минеральный азот) и актиномицетов в образцах составило $5,8 \cdot 10^4$ – $6,9 \cdot 10^4$ КОЕ/г, целлюлозаразрушающих микроорганизмов – $1,0 \cdot 10^3$ – $4,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г, нитрификаторов – $2,2 \cdot 10^4$ – $4,1 \cdot 10^4$ КОЕ/г и фосфатмобилизаторов – $1,0 \cdot 10^2$ – $3,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г. Микромицеты выявлены в количестве $1,5 \cdot 10^6$ – $4,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г. При этом олиготрофы (в том числе азотфиксаторы) в образцах не были обнаружены или присутствовали в очень низком количестве ($< 1,0 \cdot 10^2$ КОЕ/г). В соответствии со шкалой для оценки степени обогащенности почв [Звягинцев, 1978] амилोलитиками и актиномицетами, аммонификаторами, олигонитрофилами (в том числе азотфиксаторами) и микромицетами анализируемые почвы были отнесены к бедным и очень бедным.

Одним из приемов восстановления биологической активности почвы является ее инокуляция микроорганизмами с агрономически ценными свойствами. Исходя из чего, вторым этапом наших исследований было выделение и отбор спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, обладающих антимикробной, азотфиксирующей и фосфатмобилизующей активностями и создание консорциума на их основе. Внесение 5%-ного рабочего раствора данного консорциума с нормой расхода 50 мл/растение позволило повысить содержание микроорганизмов основных экологотрофических групп в почве. Выявлено, что количество фосфатмобилизаторов, амилаolitikов и актиномицетов после обработки консорциумом увеличилось в 4 раза, нитрификаторов – в 20 раз (до обработки $2,2 \cdot 10^4$ КОЕ/г, после обработки – $5,0 \cdot 10^5$ КОЕ/г), целлюлозаразрушающих микроорганизмов – в 58 раз (до обработки $1,0 \cdot 10^3$ КОЕ/г, после обработки – $5,8 \cdot 10^4$ КОЕ/г). Численность микромицетов уменьшилось в 3,4 раза (до обработки $4,5 \cdot 10^6$ КОЕ/г, после обработки – $1,3 \cdot 10^6$ КОЕ/г), аммонификаторов осталось без изменений (рис.). Олиготрофы (в том числе азотфиксаторы) после обработки выявлены в количестве $1 \cdot 10^3$ КОЕ/г.



1 – аммонификаторы, 2 – амилаolitikи и актиномицеты, 3 – целлюлозолитики, 4 – олиготрофы, в т. ч. азотфиксаторы, 5 – нитрификаторы, 6 – микромицеты, 7 – фосфатмобилизаторы

Рис. Сравнительная характеристика основных функциональных групп микроорганизмов почвы до и после обработки консорциумом бактерий *Bacillus* sp.

Данные результаты могут свидетельствовать о необходимости дальнейшего изучения почвенного микробценоза голубики высокорослой и разработки подходов направленного регулирования его состава, что позволит повысить биологическую активность почвы и получить экологически чистую ягодную продукцию премиум-класса.

Литература

Звягинцев Д. Г. Биологическая активность почв и шкалы для оценки некоторых ее показателей // Почвоведение. 1978. № 6. С. 48–54.

A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application : Special Issue on Plant Microbiome / S. Compant, A. Samad, H. Faist, A. Sessitsch // Journal of Advanced Research. 2019. Vol. 19. P. 29–37.

Comparison and interpretation of characteristics of Rhizosphere microbiomes of three blueberry varieties / Y. Zhang, W. Wang, Z. Shen [et al.]// BMC Microbiology. 2021. Vol. 21. DOI: 10.1186/s12866-021-02092-7

Effects of Soil Properties and Microbiome on Highbush Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) Growth / Y. Zhou, Y. Liu, X. Zhang [et al.]// Agronomy. 2022. Vol. 12, N 6. Art. 1263. DOI: 10.3390/agronomy12061263

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *DESMODESMUS COMMUNIS*

Е. А. Буденкова, Н. В. Костюшина, Е. В. Каширских, О. О. Бабич

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград,
KBudenkova@gmail.com

Микроводоросли восприимчивы к изменению условий окружающей среды, в которой они обитают. В ходе приспособительных реакций в ответ на влияние внешних факторов (физических и химических) может меняться качественный и количественный состав первичных и вторичных метаболитов микроводорослей. Микроводоросль *Desmodesmus sp.* Это перспективный объект для получения сырья, служащего субстратом для производства биотоплива [Sarkar, Bhowmick T., Gayen, 2024]. Несмотря на это, промышленное использование штаммов *Desmodesmus sp.* ограничено недостаточно высоким выходом ценных метаболитов. В связи с чем, целью данной работы является подбор рациональных параметров культивирования *Desmodesmus communis* для увеличения выхода экзополисахаридов с помощью факторного эксперимента.

Методы и материалы. Объект исследования: микроводоросль *Desmodesmus communis* S-313 (коллекции культур микроводорослей IPPAS, Институт физиологии растений РАН им. К. А. Тимирязева, Россия). Для культивирования и проведения факторного эксперимента использована питательная среда A+B (Sueoka) [IPPAS – коллекция ... , 1991]. Физико-химические условия культивирования варьировали согласно плану матрицы двухуровневого полного факторного эксперимента (ПФЭ-2). Проведены две серии экспериментов: в отношении физических факторов, ПФЭ I (азрация, рН и температура), и в отношении химических факторов, ПФЭ II (концентрация NH_4Cl , концентрация K_2HPO_4 , концентрация $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). По результатам проведения ПФЭ-2 строили уравнение регрессии. Концентрацию биомассы определяли гравиметрически. Концентрацию экзополисахаридов (ЭПС) определяли антронсерноокислым

методом (градуировочная кривая построена по сахарозе). Экстракцию хлорофилла проводили с использованием этанола 96 %.

Результаты. В табл. 1 показан план полного факторного эксперимента I, а также результирующие значения откликов.

Таблица 1

Результат ПФЭ I

№	Декодированные уровни факторов			Отклики, выход продукта		
	фактор 1 (X ₁)	фактор 2 (X ₂)	фактор 3 (X ₃)	отклик 1 (Y ₁)	отклик 2 (Y ₂)	отклик 3 (Y ₃)
	Аэрация	pH	Температура	Биомасса	ЭПС	C _a /C _b
			°С	г/л	г/г	
1	Ф	5,5–6,0	20	0,173	0,433	1,78
2	ПП	5,5–6,0	20	1,007	0,041	2,17
3	Ф	8,5–9,0	20	0,440	0,085	1,79
4	ПП	8,5–9,0	20	1,453	0,021	1,58
5	Ф	5,5–6,0	30	0,267	0,184	1,88
6	ПП	5,5–6,0	30	0,780	0,104	3,01
7	Ф	8,5–9,0	30	0,573	0,040	1,49
8	ПП	8,5–9,0	30	0,880	0,064	1,62
К.	П	7,0–7,5	25	0,340	0,146	1,71

Ф – культивирование в колбе закрытой фольгой, ПП – культивирование в колбе с ватной пробкой и при перемешивании 100 об/мин, П – культивирование в колбе с ватной пробкой, ЭПС – экзополисахариды

Значимые коэффициенты в соответствующих линейных уравнениях регрессии представлены в табл. 2. Знак «+» перед коэффициентом какого-либо компонента уравнения указывает на то, что фактор находится в лимитирующей области, а знак «-» на то, что значения фактора – в ингибирующей.

Таблица 2

Уравнение регрессии по результатам полного факторного эксперимента (ПФЭ)

ПФЭ	Параметр	Уравнение регрессии
I	Биомасса	$y = 0,69 + 0,33X_1$
	ЭПС	$y = 0,12 - 0,06X_1 - 0,06X_2 + 0,05X_1X_2 + 0,05X_1X_3$
	C _a /C _b	$y = 1,91 - 0,29X_2$
II	Биомасса	$y = 0,55 - 0,035X_1 + 0,043X_2 + 0,036X_3 - 0,033X_1X_2 - 0,029X_1X_3 - 0,044X_1X_2X_3$
	ЭПС	$y = 0,211 + 0,0138X_2X_3$
	C _a /C _b	-

I – ПФЭ по физическим факторам (X₁ – аэрация, X₂ – pH, X₃ – температура); II – ПФЭ по химическим факторам (X₁ – концентрация NH₄Cl, X₂ – концентрация K₂HPO₄, X₃ – концентрация MgSO₄·7H₂O), ЭПС – экзополисахариды

Проведение ПФЭ позволило увеличить выход ЭПС в среднем в 3 раза по сравнению с контрольным значением. По результатам факторных экспериментов можно заключить, что на синтез ЭПС влияет в боль-

шей степени уровень азотации (больше ЭПС синтезируется при слабой азотации) и уровень pH (больше ЭПС синтезируется в кислой среде), а также выделению ЭПС способствует увеличение концентраций гидрофосфата калия и сульфата магния в составе питательной среды. При этом на прирост биомассы оказывает положительное влияние интенсивность азотации, увеличение содержания гидрофосфата калия и сульфата магния в составе питательной среды, но отрицательное влияние оказывает увеличение концентрации хлорида аммония в среде. На соотношение хлорофилла а и b статистически значимое влияние оказывает лишь уровень pH среды.

Схожие результаты были получены в исследовании Sarkar и др., когда модификация химического состава питательной среды позволила повысить накопление углеводов в 1,3–1,5 раз [Sarkar, Bhowmick, Gayen, 2024]. В работе Nagappan и др. также упоминается что в условиях дефицита источника азота в питательной среде наблюдается увеличение содержания углеводов на 18,3 % по сравнению с прочими исследуемыми штаммами микроводорослей [Nagappan, Kumar, 2022].

Подбор наиболее рационального режима культивирования микроводоросли S-313 может быть использован для оптимизации устойчивого производства различных таких вторичных метаболитов как экзополисахариды и пигменты, имеющих биотехнологическое и биомедицинское применение.

Литература

IPPAS – коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР / М. Г. Владимирова, Е. Д. Барцевич, И. А. Жолдаков [и др.] // Каталог культур коллекций СССР. 1991. С. 8–61.

Nagappan S., Kumar G. Investigation of four microalgae in nitrogen deficient synthetic wastewater for biorefinery based biofuel production // Environ. Technol. Innov. 2021. Vol. 23. Art. 101572.

Sarkar S., Bhowmick T. K., Gayen K. Enhancement for the synthesis of bio-energy molecules (carbohydrates and lipids) in *Desmodesmus subspicatus*: experiments and optimization techniques Moreira // Preparative Biochemistry & Biotechnology. 2024. Vol. 54, N 3. P. 343–357.

РОЛЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *PANTOEA BRENNERI* В ПОВЫШЕНИИ БИОДОСТУПНОСТИ ПОЧВЕННОГО ФОСФОРА И ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПАТОГЕНОВ

Д. С. Бульмакова, Л. В. Сокольников, А. Д. Сулейманова

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
daria_bulmakova@mail.ru

Почва играет ключевую роль в производстве продуктов питания. Однако существующие методы ведения сельского хозяйства, в частности, чрезмерное применение минеральных удобрений и химических пестицидов, приводит к негативным последствиям. Альтернативным решением является внедрение в сельское хозяйство биопрепаратов на основе почвенных штаммов микроорганизмов, относящихся к группе RGPB (plant growth-promoting bacteria, стимулирующие рост растений бактерии). Одними из них являются представители рода *Pantoea*. Выделенные нами ранее почвенные изоляты *P. brenneri* (3.1, 3.2, 3.5.2, 3.6.1) обладают различными механизмами стимулирования роста растений, включая синтез гидролитических ферментов, деструкция цианидов, продукция фитогормонов и сидерофоров, фунгицидная активность против фитопатогенов [Иткина, Сулейманова, Шарипова, 2021], в связи с чем являются эффективной основой для создания биопрепаратов.

Разработка подходов к увеличению доступности фосфора в почве – одна из важнейших задач современного агропроизводства. Ранее для изолятов *P. brenneri* была показана способность к мобилизации как неорганических, так и органических труднорастворимых соединений фосфора в условиях *in vitro* [Phosphate solubilization ... , 2023]. Представляло интерес изучить данные функции штаммов в условиях почвы. Поэтому целью дальнейшей работы явилась оценка роли штаммов *P. brenneri* в повышении биодоступности почвенного фосфора и защите растений от фитопатогенов.

На первом этапе работы готовили четыре варианта микрокосмов, используя почву с низким содержанием фосфора, отобранную с полевых угодий после сбора урожая: в первом случае в исходную почву вносили суспензию клеток *P. brenneri* ($\sim 1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) (1) и физиологический раствор (2), в другом использовали стерильную почву с добавлением суспензии *P. brenneri* (3) и физиологического раствора (4). Микрокосмы инкубировали 15 сут/ в инкубаторе с 15:9-часовым циклом день:ночь при 30 °С и влажности 55 %. В дни начала и окончания эксперимента отбирали образцы почвы, которые использовали для дальнейшего анализа. Определяли количество доступного фосфора по методу [Estimation of available ... , 1954]. В экспериментах со стерильной и нестерильной почвой количество фосфора при использовании штаммов увеличилось в среднем на 10–28 % по сравнению с контролем (без штаммов). Определяли фосфатазную и фитазную активность, которую также выражали в ко-

личестве свободных фосфатов, определенном в почвенной суспензии, по методикам [Tabatabai, Bremner, 1969; Long-term addition ... , 2015; Priya, Sahi, 2009]. Наибольшее число фосфатов в суспензии стерильной и нестерильной почвы показано для штамма *P. brenneri* 3.5.2 при анализе активности кислой фосфатазы. При этом к концу эксперимента наблюдали увеличение их числа в среднем на 42 % по сравнению с контролем. В случае с анализом активности щелочной фитазы наибольшее число свободных фосфатов наблюдали в почвенной суспензии со штаммом *P. brenneri* 3.2: по сравнению с контролем их число увеличилось в среднем на 35 %. При сравнении результатов фитазной активности с фосфатазной наблюдали схожую картину в отношении штаммов. Число свободных фосфатов в почвенной суспензии при анализе активности кислой фитазы увеличивалось в среднем на 22–30 %, при анализе активности щелочной фитазы на 13–18 %. Показано, что все исследуемые штаммы подкисляли почву – уровень pH снижался со значений 6,5–6,7 до 5,3–5,5.

Таким образом, мы показали, что интродукция в почву штаммов *P. brenneri* оказывает влияние на такие факторы, как содержание доступного фосфора в почве, уровень ее pH, активность фитаз и фосфатаз. Снижение уровня pH (предположительно за счет продукции органических кислот) и повышение активности ферментов приводит к увеличению содержания свободных фосфатов в почве, что подтверждает наличие различных механизмов фосфатмобилизации у изучаемых штаммов.

Другой, не менее важной проблемой является вопрос защиты сельскохозяйственных растений от возбудителей болезней. Помимо фунгицидной активности против широкого спектра фитопатогенных микроорганизмов (*Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Ascochyta kamchatica*, *Colletotrichum coccodes*), штаммы *P. brenneri* обладают антибактериальной активностью в отношении фитопатогенной бактерии *Erwinia amylovora*, вызывающей бактериальный ожог плодовых деревьев. Ранее антагонистическая активность была показана в условиях *in vitro* [Антагонистические штаммы ... , 2023]. Однако это позволило оценить лишь потенциальные биотические взаимоотношения между бактериями в модельной системе. Для скрининга на предмет использования штаммов в качестве агента биологического контроля мы проводили эксперименты на плодах груши. Так, антагонистический эффект наблюдался при предварительной (профилактической) обработке груш штаммами *P. brenneri*. При этом терапевтическая обработка груш штаммами спустя 24 ч после заражения патогеном не приводила к защитному действию. Проводятся дальнейшие эксперименты по изучению молекулярных механизмов антагонистической активности штаммов *P. brenneri* в отношении *E. amylovora*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-76-01078.

Литература

- Антагонистические штаммы *Pantoea brenneri* как средства защиты растений / Д. С. Бульмакова, Г. И. Шагисва, Д. Л. Иткина, О. А. Ленина [и др.] // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57. С. 352–361.
- Иткина Д. Л., Сулейманова А. Д., Шарипова М. Р. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 204–214.
- Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate / S. R. Olsen, C. V. Cole, F. S. Watanabe, L. A. Dean // Washington : USDA Cir. 1954. Vol. 939. 19 p.
- Long-term addition of organic fertilizers has little effect on soil organic phosphorus as characterized by ³¹P NMR spectroscopy and enzyme additions / K. E. Annaheim, A. L. Doolette, R. J. Smernik [et al.] // Geoderma. 2015. Vol. 257. P. 67–77.
- Phosphate solubilization and plant growth promotion by *Pantoea brenneri* soil isolates / A. Сулейманова, Д. Булмакова, Л. Сокольников [et al.] // Microorganisms. 2023. Vol. 11. Art. 1136. DOI: 10.3390/microorganisms11051136
- Priya P., Sahi S. V. Influence of phosphorus nutrition on growth and metabolism of Duo grass (*Duo festulolium*) // Plant Physiol Biochem. 2009. Vol. 47. P. 31–36.
- Tabatabai M. A., Bremner J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity // Soil Biol. Biochem. 1969. Vol. 1. P. 301–307.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НАНОКЛАСТЕРОВ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ К ТЯЖЁЛЫМ МЕТАЛЛАМ И АНТИБИОТИКАМ

Г. Л. Бурьгин, А. С. Астанкова, Ю. А. Филиппчева

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
Саратовский научный центр РАН, Саратов, buryingl@gmail.com

Почвенные и ризосферные бактерии обитают в условиях постоянно меняющегося химического состава окружающей среды, обусловленного неоднородностью почвенных частиц и продукцией вторичных метаболитов многочисленных живых организмов, в том числе антибиотиков различных микроорганизмов и экссудатов корней растений. Под действием естественного отбора у бактерий сформировалось несколько механизмов устойчивости к высоким концентрациям ионов металлов, токсинов, антибиотиков и других биологически активных веществ, способных снизить активность метаболизма или привести к гибели клетки. Одним из широко распространённых молекулярных механизмов удаление избытка катионов металлов и, одновременно, проявления множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий является функционирование специальных RND эффлюксных помп (англ. «resistance-nodulation-division efflux pump»), обеспечивающих резистентность бактерий к ионам меди, серебра, кадмия, хрома, кобальта и других тяжёлых металлов. В состав каждой из таких RND помп входит несколько белковых субъединиц, переносящих катионы из периплазмы за пределы наружной мембраны. RND-системы различаются по специфичности и набору токсикантов, ко-

торые они удаляют из клеток, однако общность их строения предполагает сходство их функционирования.

Нарушение функционирования RND-систем эффлюкса приводит к снижению или даже полной потери резистентности бактерии к токсиканту (тяжелому металлу или антибиотику), что делает весьма перспективным поиск ингибиторов таких систем для лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. С развитием нанотехнологий стало возможным создание кластеров атомов с заданными размерами, формой и свойствами. В литературе имеется информация о возможном взаимодействии нанокластеров серебра с белком TolC, являющимся неспецифическим трансмембранным компонентом RND-систем эффлюкса.

В данной работе была изучена устойчивость 20 ризосферных штаммов, относящихся к различным семействам *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria*, в отношении высоких концентраций солей меди, кадмия, кобальта, цинка, свинца и серебра, а также таких антибиотиков, как эритромицин и карбенициллин. Для каждого токсиканта рассчитывались значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК), угнетения роста на 50 % (EC_{50}) и максимальная толерантная концентрация (МТК) относительно контрольной культуры (без токсикантов).

Анализ результатов показал, что штаммы рода *Azospirillum* в отношении всех токсикантов оказались наиболее чувствительными, а штамм *Achromobacter insolitus* LCu2 показал способность к росту при концентрациях более 1 мМ солей меди (II), цинка (II), кадмия (II) и свинца (II), в отличие от варианта с добавлением в среду культивирования нитрата серебра (I). Все исследованные нами ризосферные штаммы были чувствительны к эритромицину и карбенициллину.

В геноме штамма *Achromobacter insolitus* LCu2 (номер в GenBank – CP038034) было выявлено 8 генных кластеров, кодирующие белки шести типов RND-систем. Добавление в среду культивирования штамма LCu2 нанокластеров серебра не приводило к изменению ростовых характеристик бактериальной культуры. Однако присутствие нанокластеров значительно (в 40–70 раз) снижало значения EC_{50} в отношении солей тяжелых металлов, к которым штамм был устойчив, до значений, достоверно не различающихся со штаммами чувствительными к соответствующему токсиканту. Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать вывод об устойчивости штамма *Achromobacter insolitus* LCu2 к высоким концентрациям меди, цинка, кадмия и свинца, обусловленную функционированием специфических систем эффлюкса RND-типа, которые блокируются нанокластерами серебра, после чего бактериальные клетки становятся чувствительными к токсикантам.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00520, <https://rscf.ru/project/24-24-00520/>.

ШТАММЫ ПСЕВДОМОНАД, ВЫРАБАТЫВАЮЩИЕ 2-ГЕКСИЛ, 5-ПРОПИЛРЕЗОРЦИН, КАК АГЕНТЫ БИОКОНТРОЛЯ ГРИБНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ

**З. Р. Вершинина^{1,2}, О. В. Чубукова^{1,2}, Л. Р. Хакимова^{1,2},
А. Ш. Бигалева²**

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского ФИЦ РАН, Уфа, zilyaver@mail.ru

²Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа

Бактерии рода *Pseudomonas*, являясь типичными представителями почвенного биоценоза, способны быстро и успешно колонизировать ризосферу растения-хозяина. Представители этой группы микроорганизмов не только могут оказывать стимулирующее действие на развитие растений, благодаря синтезу регуляторов роста и улучшению фосфорного питания растений, но и являются антагонистами фитопатогенов за счет синтеза широкого спектра антимикробных метаболитов. Наиболее известные антибиотики, продуцируемые *Pseudomonas* spp. включают 2,4-диацетилфлороглюцинол, феназины, пирролнитрин, цианид водорода, 2-гексил, 5-пропилрезорцин (HPR) и др. HPR представляет собой небольшую молекулу, принадлежащую к группе алкирезорцинов, которая синтезируется различными бактериями и обычно секретируется из клетки в окружающую среду. Гены *dar*, ответственные за продукцию HPR, были впервые идентифицированы у *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* BL915. Данный штамм синтезирует HPR для защиты от различных почвенных фитопатогенных грибов, однако эта активность не является единственной функцией HPR. Существуют данные о возможной роли HPR в формировании биопленок, аналогично феназинам, действуя как сигнал для «чувства кворума». Меж- и внутривидовые взаимодействия на основе кворум сенсинга могут способствовать эффективному формированию биопленки и установлению устойчивых симбиотических ассоциаций с растением-хозяином. Таким образом, изучение генов *dar* у псевдомонад не только актуально в рамках проектов, посвященных защите сельскохозяйственных растений от болезней, но и в фундаментальных исследованиях факторов формирования биопленок псевдомонадами, критичных для эффективной колонизации ризосферы.

Целью исследования являлся поиск типовых штаммов псевдомонад с фунгистатической активностью, обусловленной выработкой HPR, а также создание рекомбинантных штаммов со сверхэкспрессией гена *darA* и изучение их противогрибковых свойств.

Объектом исследования стал промышленный штамм *P. chlororaphis* ВКПМ В-9444, идентифицированный как *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, относящийся к типовому штамму, зарегистрированному в Биоресурсном

центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (БРИ ВКПМ).

С использованием высокоточной полимеразы Q5 (NEB, Великобритания) ген *darA* из *P. chlororaphis* ВКПМ В-9444 был амплифицирован с помощью праймеров, в состав которых были введены сайты рестрикции BamHI и HindIII. Далее целевой ген был встроен в вектор pTurboGFP под регуляцией T5 промотора, для чего амплификат был разрезан рестриктазами BamHI и HindIII и клонирован по указанным сайтам в векторе pTurboGFP вместо гена зеленого флуоресцентного белка *GFP*. Далее фрагмент, включающий промотор T5+*darA*, был вырезан из конструкции pTurbo+*darA* по сайтам рестрикции XhoI и NheI и переклонирован в плазмиду pJN105, которая в дальнейшем была использована для трансформации штамма *P. chlororaphis* ВКПМ В-9444.

Для исходных и рекомбинантных штаммов *P. chlororaphis* ВКПМ В-9444 был исследован уровень экспрессии гена *darA* посредством количественной оценки относительных уровней экспрессии транскриптов методом ПЦР в реальном времени. Для рекомбинантных бактерий было показано повышение уровня экспрессии целевого гена в 3 раза по сравнению с исходными штаммами.

В качестве тест-штаммов для определения фунгистатической активности исходных и рекомбинантных штаммов были использованы грибы *F. graminearum* ВКМ 1668, *F. culmorum* ВКМ 844, *M. nivale* ВКМ 3106 и *V. sorokiniana* из Коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН. Было показано, что у трансформированного геном *darA* штамма повышается фунгистатическая активность в среднем на 20–30 % по сравнению с исходным штаммом. Полученные данные продемонстрировали возможность использования рекомбинантных псевдомонад в составе биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенов.

Использование биологических препаратов, созданных на основе бактерий, обладающих фунгистатическими свойствами – это эффективный, экологичный и экономичный способ предотвращения грибных заболеваний растений. Создание рекомбинантных биопрепаратов из бактериальных штаммов, отличающихся повышенной выработкой фунгистатических веществ и способных лучше колонизировать корни растений в почве, является перспективным направлением биотехнологии и представляет большой теоретический и практический интерес.

РАЗРАБОТКА СИНБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Е. А. Гаврилова¹, Я. М. Монир¹, А. М. Ежкова², В. О. Ежков²,
Е. В. Никитина^{1,3}, Д. Р. Яруллина¹, А. Р. Каюмов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, public.mail@kpfu.ru

² Казанская государственная академия ветеринарной медицины
им. Н. Э. Баумана, Казань, kgavm_baumana@mail.ru

³ Казанский национальный исследовательский технологический университет
Казань, office@kstu.ru_Alalila@yandex.ru

В рамках перехода к органическому сельскому хозяйству и функциональному питанию во всем мире интенсивно разрабатываются новые экологически чистые кормовые добавки-пробиотики. Пробиотики – это «живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина». Пробиотики улучшают состав кишечной микробиоты; благодаря повышенной адгезии к слизистым оболочкам, а также выработке антибактериальных веществ они способны подавлять рост патогенной микрофлоры. Также они поддерживают барьерную функцию кишечника за счёт модуляции экспрессии генов эпителия, что препятствует попаданию токсичных веществ в организм хозяина.

Пробиотические бактерии могут взаимодействовать с эпителиальными и дендритными клетками, которые играют важную роль во врождённом и адаптивном иммунитете, а также с моноцитами и лимфоцитами. Они взаимодействуют, например, с толл-подобными рецепторами и за счёт этого участвуют в модуляции иммунной системы хозяина. Также показано, что присутствие пробиотических бактерий в кишечнике ведёт к увеличению длины микроворсинок. Увеличение площади всасывания улучшает усвояемость кормов. Многие пробиотические бактерии участвуют в разложении сложных соединений, способны вырабатывать витамины и аминокислоты, необходимые организму.

В качестве пробиотиков могут применяться микроорганизмы, в том числе рода *Lactiplantibacillus*. Лактобактерии широко используются в различных биотехнологических процессах, например, в молочной промышленности, при производстве мяса, силосовании кормов, производстве пробиотиков. Данные микроорганизмы обладают способностью подавлять рост других бактерий, в том числе и патогенных, за счет продукции органических кислот, перекиси водорода и бактериоцинов.

Ранее в лаборатории «Молекулярная генетика микроорганизмов» был получен новый штамм *Lactiplantibacillus plantarum* AG10 из клеверного силоса. Штамм использовался в качестве бактериальной части при разработке синбиотической кормовой добавки для сельскохозяйственных птиц в сочетании с агроминералами (бентонитом и цеолитом). Целью ра-

боты являлось охарактеризовать пробиотические свойства данного штамма *in vitro*, в модельных условиях в качестве компонента закваски для молочнокислых продуктов, а также в качестве компонента синбиотического препарата в экспериментах *in vivo* на перепелах (работа выполнена с одобрения локального этического комитета КФУ – протокол № 40 от 9 марта 2023).

Оценили пробиотические свойства штамма *Lactiplantibacillus plantarum* AG10 *in vitro*: кислотообразующую активность, скорость закисления среды, устойчивость к желчи и кислотам, адгезию к эпителиальным клеткам, антагонистическую активность в отношении ряда условно-патогенных бактерий. Выявили высокие показатели по всем исследуемым характеристикам, что делает данный штамм перспективным для использования в пищевой и сельскохозяйственной промышленности.

Далее оценили способность нового штамма подавлять рост условно-патогенных микроорганизмов в модельных условиях контаминации молока. При хранении в течение 21 сут. наблюдалось снижение количества условно-патогенных бактерий и увеличение доли лактобактерий.

После исследования штаммов на антагонистическую активность и сохранение жизнеспособности при добавлении агроминералов провели оценку влияния препарата на перепелов. Штамм *Lactiplantibacillus plantarum* AG10 в питательной среде на основе молочной сыворотки добавляли в рацион перепелов, также использовали комбинацию штамма с агроминералами для оценки эффективности синбиотического препарата. На протяжении экспериментов птиц взвешивали и оценивали прирост биомассы. По окончании опытов оценили массу различных внутренних органов птиц, показатели биохимического и форменного анализа крови, оценили показатели качества яиц и мяса, состав микробиоты кишечника. В работе проведен сравнительный анализ данных показателей у различных групп птиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ-22-16-00040)

ЭВОЛЮЦИЯ БЕЛКОВ, ПОХОЖИХ НА АКТИВАТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ (TALES) У ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ

Э. М. Гайсина¹, Е. И. Кырова², Ю. Л. Орлов^{1,3}, А. Н. Игнатов¹

¹РУДН им. Патриса Лумумбы, Москва, gaysina-em@rudn.ru

²Институт защиты растений РАН, Санкт-Петербург

³Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)
Москва, orlov-yul@rudn.ru

Белки-эффекторы бактериальной секреторной системы третьего типа (Type 3 Secretion System – T3SS), структурно похожие на активаторы транскрипции эукариот (Transcription Activator-Like Effectors – TALEs), являются важными факторами вирулентности фитопатогенных бактерий родов *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia/Paraburkholderia* (*syn. Mycetohabitans*), и *Acidovorax* [Eukaryotic features ... , 2001; Type III-dependent ... , 2002; DNA-binding proteins ... , 2015]. TALEs связываются с регуляторными участками ДНК организма-хозяина с помощью тандемного домена из 33–35 аминокислотных повторов, индуцируя таким образом экспрессию целевых генов, формирующих благоприятную среду для микроорганизма. Эти повторы обладают высокой консервативностью, и различаются по двум варибельным аминокислотам, которые узнают целевые нуклеотиды в составе ДНК-мишени. Повторы TALEs с необычной длиной аминокислотной последовательности нарушают строгое правило связывания «один повтор к одному основанию ДНК» и привносят полезную для бактерии изменчивость в связывании TALEs с ДНК хозяина [DNA-binding proteins ... , 2015; Transcription activator-like ... , 2023]. Хотя, эволюция TALEs все еще плохо изучена, их предполагаемое происхождение показано в метагеноме морских бактерий [DNA-binding proteins ... , 2015]. Известно, что в симбиозе бактерий *Mycetohabitans rhizoxinica* с грибом *Rhizopus microsporus* белки, напоминающие TALEs – TAL-подобные белки *Burkholderia* (Bats), связывают ДНК, но у них отсутствуют N- и C-концевые участки, кодирующие консервативные сигналы трансмембранного транспорта и ядерной локализации, а также активационный домен. Несмотря на структурные различия, Bats могут секретироваться и локализоваться в ядре клетки хозяина [Transcription activator-like ... , 2023]. Таким образом, функциональные гомологи-предки TALEs могут иметь существенно меньшую длину последовательностей и длину повторов, отличающихся от известных 33–35 аминокислот. Для определения генов-гомологов TALEs использовали базы данных NCBI GenBank и последовательности вновь полученных геномов вида *X. campestris*. В результате поиска были выявлены новые гомологи TALEs в некоторых видах родов *Xanthomonas* [Кырова, Игнатов 2024], *Pseudomonas* и других протеобактерий. Значительная часть известных к настоящему времени и вновь выяв-

ленных генов TALEs фланкирована мобильными генетическими элементами при хромосомной локализации и/или находится в составе бактериальных плазмид с признаками межвидового переноса. Движущими механизмами эволюции TALEs являются сбой репликации, сдвиг рамки считывания из-за индела, Tn3-опосредованная транспозиция, и неравномерная рекомбинация в плазмидах, несущих разные варианты TALEs. Большинство бактерий, несущих гены TALEs, имеют общий бактериофагов/профагов [Xanthomonas Phage ... , 2024], таким образом, обеспечивая возможный горизонтальный перенос TALEs между различными видами, родами и семействами фитопатогенов и эндосимбионтов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-26-00168).

Литература

Кырова Е. И., Игнатов А. Н. Вероятность избыточной функциональности TALEs в системе растение-хозяин – *Xanthomonas arboricola* // V Всероссийский конгресс по защите растений : сб. тезисов докладов. СПб. : ФГБНУ ВИЗР. 2024. 127 с.

DNA-binding proteins from marine bacteria expand the known sequence diversity of TALE-like repeats / O. de Lange [et al.] // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. P. 10065–10080.

Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: Protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper / B. Szurek, E. Marois, U. Bonas, G. Van den Ackerveken // *Plant J.* 2001. Vol. 26. P. 523–534.

Transcription activator-like effectors from endosymbiotic bacteria control the reproduction of their fungal host / I. Richter, Z. Uzum, P. Wein [et al.] // *Mbio.* 2023. Vol. 14, N 6. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.01824-23>

Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell / B. Szurek, O. Rossier, G. Hause, U. Bonas // *Mol. Microbiol.* 2002. Vol. 46. P. 13–23.

Xanthomonas Phage PBR31: Classifying the Unclassifiable / R. I. Tarakanov, P. V. Evseev, H. T. Vo [et al.] // *Viruses.* 2024. Vol. 16, N 3. Art. 406. DOI: 10.3390/v16030406

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ БИОПРЕПАРАТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

**О. А. Галуза^{1,2}, Г. И. Эль-Регистан¹, Н. А. Коротков¹,
Ю. А. Николаев¹**

¹ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

²ООО «Бавар+», Москва, olesya_galuza@mail.ru

Одной из важнейших отраслей пищевой биотехнологии является производство молочных заквасок, общий объём российского рынка которых за 2021 г. составил около 30 млрд руб. (8,8 % оборота биотехнологического рынка в России). Несмотря на такое превалирование и значимость для молочной отрасли, порядка 80–90 % заквасочных культур в России составляет импорт, главные поставщики которого расположены в Дании, Словении, Италии, Франции и других странах [Valieva, 2021]. Введение санкций, нарушение логистических цепочек и нестабильная ситуация на

рынке привела к тому, что многие предприятия, широко применявшие до недавнего времени импортные закваски, переходят на самостоятельное изготовление производственных заквасок или закупку отечественных препаратов [Что происходит на ... , 2022]. В связи с этой ситуацией, образовавшейся на российском рынке, остро встаёт вопрос о создании подходящих условий хранения и эксплуатации бактериальных заквасок и молочнокислых продуктов, поскольку известно, что сроки годности таких препаратов ограничены и для поддержания оптимальных условий хранения и транспортировки необходимо обеспечить производство холодильными камерами, рефрижераторами, датчиками и системами управления, что требует дополнительных вложений и увеличений ежемесячных затрат предприятия [Степанова, 1999]. Ещё одним критическим моментом в процессе хранения является резкое снижение жизнеспособности и активности молочнокислых бактерий (МКБ), из-за чего продукция теряет свои функциональные и пробиотические свойства. Все эти факторы обуславливают развитие интереса и актуализации научных исследований в сфере поиска и разработки новых способов продления жизнеспособности МКБ и оптимизации процесса хранения кисломолочной продукции. Одним из эффективных методов сохранения жизнеспособности является иммобилизация клеток, в том числе в гели. Это состояние аналогично тому, когда клетки пребывают в составе биопленок [Иммобилизованные клетки ... , 2018].

Целью данной работы является поиск новых способов сохранения жизнеспособности МКБ, используемых в качестве заквасок, и оценка воздействия стрессовых факторов на их выживаемость при иммобилизации в силикольно-гуматные гели (СГГ).

Объект исследования – МКБ *Enterococcus faecium* M3185. Культуру выращивали в жидкой питательной среде LB. Иммобилизацию клеток *E. faecium* стационарной фазы роста осуществляли в гели: 1) 5%-ный и 10%-ный желатиновый гель; 2) 1%-ные гели из камедей; 3) СГГ из препарата гуматов «Фульвигрейн Классик», (3-аминопропил)триэтоксисилана и органических кислот. Количество жизнеспособных клеток (как титр колониеобразующих единиц, КОЕ) определяли высевом десятичных разведений на плотные среды (микрометодом) в течение всего времени хранения.

При иммобилизации *E. faecium* в желатиновые гели с концентрацией 50 и 100 г/л доля жизнеспособных клеток сохранялась на протяжении двух месяцев на уровне 34 и 37 % соответственно, от исходного титра КОЕ, что в 4 раза превышает показатель в контрольном нестабилизированном образце (табл. 1). При иммобилизации клеток бактерий *E. faecium* в гели из камедей и последующей инкубации в течение двух месяцев наибольшая доля жизнеспособных клеток сохранялась в желлановой, гуаровой и ксантановой камедях. В желлановой камеди титр КОЕ был в 1,5 раза выше, чем в контроле, в гуаровой – в 2,4 раза, в ксантановой – в 2 раза (табл.). Полисахариды могут быть источниками питания для бактерий, что способствует пролонгированию их жизнеспособности. При

иммобилизации культуры *E. faecium* в силанольно-гуматные гели и последующем инкубировании в течение двух месяцев, наибольшее число жизнеспособных клеток сохраняется в гелях с добавлением аскорбиновой, яблочной и молочной кислоты. Их доля была, соответственно, в 63,3; 20,7 и 33,6 раз выше, чем в контрольном варианте (табл.). Бактерии способны длительно сохранять свою жизнеспособность в СГГ благодаря образованию биоплёночного фенотипа и возможности использовать органические кислоты в качестве источников энергии.

Таблица

Выживаемость МКБ при иммобилизации и хранении в разных типах геля в течение 60 сут.

Вид геля	Доля выживших клеток (%)
<i>Контроль (клетки, хранящиеся без органического геля)</i>	7,8
5%-ный желатиновый гель	34,7
10%-ный желатиновый гель	37
1%-ный гель из гуаровой камеди	19,07
1%-ный гель из геллановой камеди	12,9
1%-ный гель из ксантановой камеди	14,6
<i>Контроль (клетки, хранящиеся без СГГ)</i>	1,1
СГГ с аскорбиновой кислотой	69,6
СГГ с яблочной кислотой	22,8
СГГ с молочной кислотой	37

Полученные результаты являются основой нового подхода к повышению количества жизнеспособных клеток МКБ при их длительном хранении с помощью иммобилизации их в органические гели (желатиновые и камедевые) и гели смешанного состава (СГГ).

Силанольно-гуматные гели также способны защищать иммобилизованные клетки бактерий от внешнего воздействия негативных факторов, возникающих в процессе хранения продукции. Установлено, что СГГ эффективно защищает клетки МКБ от гибели при длительном хранении при температурах 4°C и 25°C, влажности 40, 50 и 99 %, при интенсивном освещении, а также при доступе кислорода воздуха. При хранении МКБ, иммобилизованных в СГГ, при температуре 4°C и 25°C доля жизнеспособных клеток от их исходного количества составила 58 % и 50 %, соответственно, что выше, чем в контрольных образцах в 7,1 и 2,6 раза. Хранение культуры при влажности 40, 50 и 99 % показало, что доля жизнеспособных клеток составила 33, 51 и 43 %, что было выше, чем в контрольном образце в 1,9; 2,8 и 14,3 раза. При использовании интенсивного света доля жизнеспособных клеток в СГГ была выше, чем в контроле в 3953 раза, а при доступе кислорода воздуха – в 28 раз.

Одним из важнейших преимуществ геля, помимо его низкой стоимости, оказалась способность сохранения жизнеспособных иммобилизованных клеток МКБ в течение длительного срока в условиях, не требующих

специальных затрат на их поддержание, а именно – температуры (до 25°C), влажности (от 40 до 90 %), ограничения интенсивного освещения. Это делает гель конкурентноспособным и привлекательным для производителей молочнокислой продукции и биопрепаратов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 24-24-20062 и компании ООО «Бавар+».

Литература

Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы : монография / под ред. Е. Н. Ефременко. М. : РИОР, 2018. 523 с.

Степанова Л. И. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры. В 3 т. Т. 1. Цельномолочные продукты. СПб. : ГИОРД, 1999. 384 с.

Что происходит на отечественном рынке молочных заквасок // Milknews. 2022. URL: <https://milknews.ru/longridy/rynok-molochnyh-zakvasok.html> (дата обращения: 15.01.2023).

Valieva O. Biotechnology Market Development: Global Trends and the Place of Russia // World of Economics and Management. 2021. Vol. 21, N 4. P. 82–102.

МИКРОБНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА ПАЛЬМОВОГО МАСЛА

А. Л. Герасимчук, А. Н. Сысоева, Д. А. Ивасенко

Национальный исследовательский Томский государственный университет
Томск, gerasimchuk_ann@mail.ru

Пальмовое масло широко используется в пищевой и перерабатывающей промышленности во всём мире. Основными мировыми производителями и экспортерами пальмового масла являются Индонезия (59 %) и Малайзия (25 %). По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций (Food and Agriculture Organization of the United Nations) в 2020 г. мировое производство сырого пальмового масла составило более 75 млн т. Увеличивающееся с каждым годом производство пальмового масла связано с образованием большого количества отходов. На одну тонну произведенного сырого пальмового масла приходится от 2,5 до 3,5 т отходов [Madaki, Seng, 2013]. Образующиеся отходы представляют собой вязкую водную смесь остатков целлюлозы и пальмового масла (POME – Palm oil mill effluent), сливаются в пруды-накопители и разлагаются там продолжительное время, нанося огромный ущерб окружающей среде вследствие накопления метана (тонна отходов генерирует 28 м³ метана), снижения концентрации кислорода в окружающих водоемах и ставят под угрозу устойчивость экосистемы и биоразнообразие водной и наземной среды. Сброс свежих POME в окружающую среду без какой-либо обработки может представлять опасность для людей и окружающей среды из-за большого количества токсинов, а также высокой концентрации органических и неорганических соединений.

Используемые в настоящее время очистные сооружения для жидких отходов производства пальмового масла, представляющие систему открытых лагун, не справляются с очисткой и разложением вредных органических загрязнителей [Hasanudin, Haryanto, 2018] и в итоге приводят к долгосрочным экологическим проблемам, в том числе выбросам парниковых газов [Techno-economic analysis ... , 2018].

Технология биологической переработки предполагает использование микроорганизмов для разложения сложных органических веществ, присутствующих в сточных водах. Сложные органические вещества в сточных водах окисляются в клетках микроорганизмов, таких как бактерии, грибы или водоросли, в анаэробных или аэробных условиях. Образующийся осадок можно превратить в другие продукты с добавленной стоимостью, такие как биогаз [Dominic, Baidurah, 2022].

Анаэробная биодegradация в настоящее время считается наиболее подходящим методом обезвреживания жидких отходов производства пальмового масла, содержащих высокую концентрацию органического углерода [Pollution control ... , 2010], однако и такие технологии имеют ряд серьезных недостатков [Hasanudin, Haryanto, 2018; Dominic, Baidurah, 2022].

Предлагаемая нами биотехнологическая схема касается утилизации и обезвреживания отходов производства пальмового масла, хранящихся в открытых прудах-накопителях и основана (1) на внесении активного биопрепарата на основе аэробных бактериальных штаммов-деструкторов пальмового масла и других органических веществ; (2) стимуляции аэробных процессов разложения органических отходов с помощью аэрации; (3) удалении из донных отложений масла и других органических загрязнителей методами на основе флотации, что будет способствовать разложению токсичной органики активной аэробной микрофлорой.

Разработанный нами биопрепарат представлен консорциумом из штаммов *Pseudomonas protegens* А-СМС-05 и *Gordonia paraffinivorans* А-СМС-11, выделенных в 2023 г. из городских очистных сооружений г. Сурабая, Индонезия. Оба штамма являются липофильными и растут на минеральной среде с пальмовым маслом (1 % v/v) в качестве единственного источника углерода, достигая численности клеток не менее 10^9 кл/мл при 28 °С. Штаммы не являются антагонистами и не препятствуют росту друг друга, не проявляют патогенности.

В составе консорциума штаммы активно росли в присутствии 5 % пальмового масла (не менее 10^8 кл/мл), о гидролизе масла в ходе культивирования свидетельствовало увеличение значения кислотного числа масла более чем в три раза по сравнению с абиотическим контролем, а также увеличение количества свободных жирных кислот (С16:1, С18:2) в культуральной жидкости. Также под воздействием консорциума появились жирные кислоты 18:0, 18:1, которых не обнаружено в контроле без внесения бактерий.

Еще один лабораторный эксперимент с участием консорциума проведен в условиях смоделированных прудов-накопителей, в ходе которого через 33 сут. было показано снижение общего количества жира в отходах более чем на 20 % под воздействием консорциума по сравнению с контрольными образцами. В качестве модели прудов-накопителей выступали стеклянные аквариумы объемом 5 л со смесью из 2 л нестерильной водопроводной воды и 100 г сырых отходов пальмового масла из прудонакопителя (предприятие PT Agro Indomas, Индонезия), представляющих вязкую массу с массовым содержанием жира 89,5 %. Результаты анализа показали, что экспериментальный образец с аэрацией и добавлением консорциума штаммов содержал наименьшее количество жира в сухом веществе (64,3 %) по сравнению с контролем с аэрацией, но без добавления бактерий (68,5 %) и абсолютным контролем (82,0 %). Кроме того, в экспериментальном аквариуме выявлено значимое повышение свободных жирных кислот, что свидетельствует о деструкции отходов пальмового масла под влиянием консорциума.

Таким образом, консорциум на основе липофильных штаммов *Pseudomonas protegens* А-СМС-05 и *Gordonia paraffinivorans* А-СМС-11 эффективно гидролизует пальмовое масло и может быть рекомендован для проведения опытно-промышленных испытаний и применения в биотехнологиях очистки промышленных сточных вод, содержащих отходы производства пальмового масла.

Работа выполнена при поддержке гранта № 075-15-2022-1152 (Постановление № 619 от 8 апреля 2022 г.).

Литература

- Dominic D., Baidurah S. Recent developments in biological processing technology for palm oil mill effluent treatment – A review // *Biology*. 2022. Vol. 11. Art. 525.
- Hasanudin U., Haryanto A. Palm oil mill effluent recycling system for sustainable palm oil industries // *Asian J. Environ. Biotechnol.* 2018. Vol. 2, N 1. P. 52–62.
- Madaki Y. S., Seng L. Palm oil mill effluent (POME) from Malaysia palm oil mills: Waste or resource // *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 2013. Vol. 2, N 6. P. 1138–1155.
- Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end-of-pipe processes / T. Y. Wu, A. W. Mohammad, J. Md. Jahim, N. Anuar // *Journal of Environmental Management*. 2010. Vol. 91, N 7. P. 1467–1490.
- Techno-economic analysis of biogas power plant from POME (palm oil mill effluent) / M. Gozan, N. Aulawy, S. Rahman, R. Budiarto // *Int. J. Appl. Eng. Res.* 2018. Vol. 13, N 8. P. 6151–6157.

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ КОНТЕКСТ И МЕТАТРАНСКРИПТОМИКА ПАТОСИСТЕМ

Ю. В. Гоголев¹, Н. Е. Гоголева¹, Т. А. Коннова¹, Е. В. Осипова¹,
Хамо Хамза¹, А. С. Балкин²

¹Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
Казань, gogolev.yuri@gmail.com

²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
Оренбург, balkinas@yandex.ru

Для всестороннего понимания взаимодействий "хозяин-патоген" требуется знание связанных изменений экспрессии генов как у патогена, так и у хозяина. Вместе с тем традиционные подходы с использованием микрочипов или RNA-seq обычно требуют, чтобы патоген и клетки-хозяева были физически разделены перед анализом экспрессии генов. Поскольку бактериальная РНК в тотальных препаратах не превышает 5 %, прямые исследования образцов с помощью использования зондов не обеспечивают необходимую чувствительность и специфичность. Дополнительная сложность обусловлена высокой лабильностью бактериальной РНК и отсутствием надежных способов деплеции рибосомальной и транспортной РНК. Благодаря этому расчетная глубина прочтения при RNA-seq должна быть увеличена более чем на порядок и может достигать нескольких сотен миллионов ридов на образец. Кроме того, данная технология предполагает фрагментацию транскриптов для короткого секвенирования. Хотя эта стратегия хорошо подходит для исследования профилей экспрессии в масштабе всего генома в окнах из сотен оснований, она не предоставляет информации о транскрипционном контексте (ТС), обычно обнаруживаемом в бактериальных оперонах. Этот недостаток, в частности, ограничивает нашу способность определять начало и конец транскрипта. Чтобы получить доступ к этим ориентирам транскрипции, были разработаны специальные стратегии для их специфической идентификации с разрешением в один нуклеотид. Наиболее продуктивными для исследования стартовых точек оказались методики, основанные на избирательном распознавании 5'-трифосфата, характерного для первого нуклеотида, включаемого РНК-полимеразой. В сочетании с высокопроизводительным секвенированием, эти методики открывают доступ к широкому транскриптомному ландшафту, обнаружившему беспрецедентное разнообразие некодирующих РНК, синтезируемых как в спейсерных так и кодирующих областях, как с прямой и обратной цепи бактериальной геномной ДНК [The primary transcriptome ... , 2010, A novel enrichment ... , 2016]. Характеристика и функции этого класса транскриптов представляют одну из наиболее интригующих нерешенных проблем современной биологии. Решение этой проблемы потребует пересмотра существующей модели оперонной организации геномов бактерий с включением в нее транскрипционного контекста и новых механизмов контроля экспрессии.

Несмотря на то что модельный организм *Escherichia coli* хорошо изучен, точные позиции сайтов инициации транскрипции у него еще предстоит определить. Для этого необходимо извлечь непротранскрибированную РНК с интактным 5' концом, для чего была предложена стратегия Cappable-Seq [A novel enrichment ... , 2016]. В основе метода лежит селективное выделение стартовых участков транскрипции РНК, содержащие три остатка фосфорной кислоты, в отличие от протранскрибированной мРНК, содержащей монофосфат или гидроксильную группу на 5' конце. Важной особенностью метода является то, что одновременно происходит очистка от рибосомной РНК, составляющей до 95 % тотальной РНК клетки. Кроме того, Cappable-Seq дает возможность количественной оценки активности выявляемых TSS, что было использовано нами для изучения транскрипции у бактерий. Используя РНК из клеток *E. coli*, выращенных в присутствии тетрациклина, новобиоцина и рифампицина, мы идентифицировали 706 кодирующих и 20509 не кодирующих транскриптов, соответствующих межгенным и внутригенным областям, которые классифицировались как элементы оперонов, 5'- и 3'-нетранслируемые области, малые РНК, новые ORFs или транскрипты с неизвестной функцией. Также было выполнено полное транскриптомное профилирование растений табака, инфицированных *Pectobacterium atrosepticum*. Это позволило сравнить бактериальные признаки в условиях *in planta* и *in vitro* и выявить потенциальных игроков, которые участвуют в переходе от несимптомной стратегии патогена к «грубой силе» [Transcriptome profiling ... , 2018]. Оказалось, что ключевым переключателем является вырабатываемый бактерией аналог метил жасмоната, который направляет защитный ответ растений по пути противостояния фитофагам, что ослабляет их иммунитет к бактериальным патогенам. Обработка растений салициловой кислотой перед инфицированием исключала развитие симптомов бактериоза.

Разработанная экспериментальная платформа оказалась эффективной для изучения взаимодействия *Salmonella enterica* и *Acanthamoeba castellanii*. Данный объект был выбран как модель для изучения взаимодействия сальмонелл с эукариотическими клеткам, в том числе с макрофагами млекопитающих и человека. Было показано, что на ранних сроках инфицирования сальмонеллы проявляют специфический паттерн экспрессии, обеспечивающий переключение с цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования на глиоксилатный шунт, подавление SPI-2, активацию SPI-1, системы хемотаксиса и биосинтеза жгутикового аппарата. Это свидетельствует об активном инфицировании протист бактериями, в отличие от предполагаемой программы персистенции в результате фагоцитоза хищником [Cappable-Seq Reveals ... , 2021].

Несмотря на перспективность описанного подхода, его широкое распространение затрудняет недостаток знаний о точной структуре оперонов большинства бактерий и соответствующих TSS для распознавания их транскриптов. Вместе с тем по мере накопления информации становится

возможным проводить все более точную классификацию как стартовых, так и терминирующих точек транскрипции оперонов с известными функциями [SMRT-Cappable-seq reveals ... , 2018].

Избыточность бактериального транскриптома предполагает, что большая часть TSS инициирует синтез некодирующих РНК с неизвестной функцией. Идентификация значительной доли нкРНК у трех микроорганизмов, является первым шагом к их функциональной идентификации. На следующем этапе была выполнена количественная оценка их транскрипционной активности в зависимости от расположения на генетической карте и анализ корреляционных связей с транскрипционной активностью соответствующего гена. Было показано, что такая связь существует не только в отношении промоторной области и прямой цепи, но также для обратной цепи, терминаторных и нетранслируемых регионов. Выяснению роли этой функциональной корреляции будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 17-14-01363.

Литература

A novel enrichment strategy reveals unprecedented number of novel transcription start sites at single base resolution in a model prokaryote and the gut microbiome / L. Ettwiller, J. Buswell, E. Yigit, I. Schildkraut // BMC Genomics. 2016. Vol. 17, N 199. DOI: 10.1186/s12864-016-2539-z

Cappable-Seq Reveals Specific Patterns of Metabolism and Virulence for Salmonella Typhimurium Intracellular Survival within Acanthamoeba castellanii / A. Balkin, A. Plotnikov, N. Gogoleva [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, N 16. DOI: 10.3390/ijms22169077

SMRT-Cappable-seq reveals complex operon variants in bacteria / B. Yan, M. Boitano, T. Clark, L. Ettwiller // Nat Commun. 2018. Vol. 9, N 1. URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-05997-6> (дата обращения: 10.07.2024).

The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori* / C. Sharma, S. Hoffmann, F. Darfeuille [et al.] // Nature. 2010. Vol. 464. P. 250–255.

Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants / V. Gorshkov, O. Petrova, A. Daminova, N. Gogoleva [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. 2018. Vol. 152. P. 957–976.

СУБСТРАТНЫЙ СПЕКТР АБОРИГЕННЫХ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АНТРОПОГЕННО НАРУШЕННЫХ ПОЧВ

Д. М. Голубев¹, Д. Д. Нестеркина¹, А. С. Коробейникова¹,
Е. А. Сескутова¹, Е. В. Глинская^{1,2}, О. В. Нечаева², Д. М. Иржанова²,
В. Н. Нечаев²

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

²Саратовский государственный технический университет им. Ю. А. Гагарина, Саратов

Загрязнение окружающей среды представляет собой одно из основных последствий технического прогресса. Сырая нефть – сложная гомогенная органическая смесь, состоящая из насыщенных и ароматических углеводородов, способных оказывать канцерогенное воздействие на живые организмы и снижать плодородие почв [Characteristics of a ... , 2018; Ezeji, Anyadoh, Ibekwe, 2007].

Наиболее успешным методом для устранения углеводородных загрязнений почв является биоремедиация – восстановление территорий с использованием живых организмов для уменьшения неблагоприятного воздействия поллютантов [Quintella, Mata, Lima, 2019]. При разработке метода по проведению очистительных мероприятий нефтезагрязнённых почв необходимо учитывать эффективность используемых штаммов углеводородоокисляющих бактерий, в частности, разнообразие подвергаемых деградации субстратов [Ezeji, Anyadoh, Ibekwe, 2007].

Целью исследования было изучение субстратного спектра аборигенных почвенных бактерий, выделенных из антропогенно нарушенных почв.

Работа проводилась на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского.

Объектом исследования являлись углеводородоокисляющие микроорганизмы, выделенные из почв антропогенно нарушенных территорий г. Когалыма Ханты-Мансийского автономного округа, главного нефтегазоносного района России (К), из проб почв земельных участков сельскохозяйственного назначения с хроническим нефтяным загрязнением на северо-западе от с. Новокривовка (Саратовская область, Советский район), на территории которых был установлен факт пролива нефтепродуктов в результате порыва нефтепровода (Н), а также из проб урбанозёмов, индустриозёмов, культурозёмов и природных почв г. Балаково (Саратовская область), промышленного центра Саратовской области (Б).

Для изучения субстратного спектра углеводородоокисляющих бактерий использовали следующие субстраты: предельные углеводороды – гексан, гептан, декан, ароматические углеводороды – толуол, фенол, а также сырую нефть.

Способность бактерий к деструкции исследуемых субстратов определяли с помощью метода лунок. Субстрат вносили в лунку диаметром 8 мм, проделанную стерильным пробочным сверлом в центре агаризованной минеральной среды М9 в чашке Петри. Вокруг лунки с субстратом осуществляли посев культур штрихом. Культивирование штаммов проводили одновременно и на поверхности твердого субстрата, и в парах углеводородов, за счет их равномерной диффузии и частичного испарения. Учет результатов осуществляли в течение недельной инкубации в термостате при 28 °С. О деструкции углеводородов судили по интенсивности роста тест-культур [Руководство к практическим ... , 1983].

По результатам эксперимента выявлено, что штаммы *Acinetobacter lwoffii* (Б), *Bacillus circulans* (Б), *B. horikoshii* (Б), *Ochrobactrum gallinifaecis* (Б), *Paenibacillus polymyxa* (Н) были способны разлагать все используемые углеводородные субстраты (рис.). Большинство указанных штаммов были отобраны в черте г. Балаково, в городе и пригородах которого расположены крупные предприятия энергетической, химической, металлургической отрасли, а также других профилей (транспортной, строительной, пищевой, легкой и пр.), один штамм *Paenibacillus polymyxa* (Н) был выделен из почв с. Новокривовка, на территории которого произошел разлив нефтепродуктов в ходе прорыва трубопровода, площадь нарушения составила 0,0082 га.

Полученные данные будут полезны при создании комплексного подхода для проведения восстановительных мероприятий антропогенно нарушенных почв. Штаммы, способные разлагать наибольшее количество субстратов, являются перспективными агентами для биоремедиации.

Литература

- Руководство к практическим занятиям по микробиологии : практ. пособие / под ред. Н. С. Егорова. 2-е изд. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1983. 251 с.
- Characteristics of a crude oil composition and its in situ waxing inhibition behavior / G. Chen [et al.] // Fuel. 2018. Vol. 218. P. 213–217.
- Ezeji U. E., Anyadoh S. O., Ibekwe V. I. Cleanup of crude oil-contaminated soil // Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. 2007. Vol. 1, N 2. P. 54–59.
- Quintella C. M., Mata A. M. T., Lima L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils // Journal of environmental management. 2019. Vol. 241. P. 156–166.

ПАНГЕНОМ ГРИБНОГО ПАТОГЕНА ЛЬНА *COLLETOTRICHUM LINI*

Е. М. Дворянинова¹, Е. А. Сигова¹, Е. Н. Пушкова¹, В. А. Павлова^{1,2},
А. М. Каплун^{1,3}, Т. А. Рожмина⁴, Д. А. Жернова¹, Н. В. Мельникова¹,
А. А. Дмитриев¹

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН
Москва, dvorianinova.em@phystech.edu

²Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова ФГБОУ ВО
«МИРЭА – Российский технологический университет», Москва

³Московский физико-технический институт

(национальный исследовательский университет), Москва

⁴Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок

Лён (*Linum usitatissimum* L.) – ценное сельскохозяйственное растение, выращиваемое для производства семян и волокна. Данная культура подвержена грибным заболеваниям, сильно снижающим объем и качество урожая. Антракноз льна, вызываемый *Colletotrichum lini*, наносит существенный экономический ущерб. При этом основным методом борьбы с антракнозом остается возделывание устойчивых сортов, а современная селекция требует понимания молекулярно-генетических механизмов патогенности. Пангеном *C. lini* способен дать наиболее полное представление об устройстве важных признаков, в том числе генетических детерминант вирулентности, на геномном уровне.

Для получения пангенома *C. lini* создана выборка, состоящая из 30 штаммов различной степени вирулентности. Согласно разработанному нами ранее протоколу выделена высококочистая высокомолекулярная геномная ДНК выбранных штаммов и секвенирована на платформах Oxford Nanopore Technologies (ONT) (SQK-LSK109/SQK-LSK114, R9.4.1/R10.4.1) и Illumina (NovaSeq 6000, 150+150 н.). Получено 3,5–8,7 млрд н. данных ONT с показателем N50 = 5–12 т. н. и 8,8–16,4 млн парноконцевых чтений Illumina. Выполнены геномные сборки согласно разработанной нами ранее схеме: Canu – Racon (2 итерации) – Medaka – POLCA. Полученные сборки обладали размером 53,9–56,8 млн н., N50 = 4,4–5,8 т. н., полнотой по BUSCO 96,6–96,8 %. В полученных сборках обнаружены митохондриальные геномы. Повторяющиеся последовательности сборок замаскированы приложением RepeatMasker, а затем аннотированы приложением Augustus или BRAKER. Для кластеризации предсказанных белков использовали приложение OrthoFinder, визуализацию результатов проводили с использованием PanGP. Пангеном *C. lini* насчитывает порядка 15 т. белковых кластеров.

Полученный пангеном *C. lini* расширяет представления об эволюции патогена на молекулярном уровне и способствует дальнейшему детальному изучению детерминант патогенности гриба, а также созданию устойчивых сортов льна.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-16-00169, <https://rscf.ru/project/22-16-00169/>.

СЕКРЕТИРУЕМЫЕ ДЕПОЛИМЕРАЗЫ У БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФИТОПАТОГЕНОВ ГРУППЫ *BACILLUS PUMILUS*

О. В. Евдокимова¹, Е. А. Семенчукова¹, Е. А. Николайчик²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
evdokimovalesia@gmail.com

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
nikolaichik@bio.bsu.by

Бактерии группы *B. pumilus* способны приспосабливаться к самым разным, меняющимся условиям окружающей среды и эффективно использовать имеющиеся ресурсы. Представители данной группы способны адаптироваться к паразитическому образу жизни и спорадически вызывать бактериозы растений [Elbanna, Elnaggar, Bakeer, 2014, First Report of ... , 2019]. Наиболее вероятной основой проявления фитопатогенных свойств предполагается продукция спектра деполимеризующих ферментов, в первую очередь деполимераз высокомолекулярных компонентов клеток растений [Characterisation of Pectinolytic ... , 2023]. Ранее нами были секвенированы и собраны геномные нуклеотидные последовательности фитопатогенных и не проявляющих фитопатогенные свойства штаммов бактерий группы *B. pumilus*. Цель данной работы – идентифицировать в геномах *B. pumilus* кодирующие последовательности секретлируемых деполимераз и сравнить секретома патогенных и непатогенного штаммов.

Содержащие сигнальные пептиды кодирующие последовательности идентифицировали в геномах исследуемых бактерий с помощью SignalP (версия 6.0; <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>), аннотацию сигнальных пептидов добавляли с помощью Sigmoid (версия 2.0b2; <https://github.com/nikolaichik/sigmoid>). Выявлено, что у фитопатогенных штаммов *B. altitudinis* 11-1-1, *B. pumilus* БИМ В-171 и *B. safensis* 33.4 количество предсказанных секретлируемых белков такое же, как и у непатогенного штамма *B. safensis* F6 (240±2). Более значительный секретом у штамма *B. altitudinis* 63-2-2: выявлено 253 кодирующие последовательности с сигнальным пептидом. Согласно результатам поиска ортологичных кластеров с помощью программы OrthoVenn3 (<https://orthovenn3.bioinfotoolkits.net/>), среди предсказанных кодирующих последовательностей большинство являются общими для всех пяти штаммов, в то же время выявлены уникальные секретлируемые белки. Из уникальных секретлируемых белков идентифицированы бактериоцин и белок семейства FixH штамма *B. altitudinis* 11-1-1, HNH эндонуклеаза штамма *B. pumilus* БИМ В-171, содержащий домен DNRLRE белок штамма *B. safensis* 33.4; остальные аннотированы как гипотетические белки. В целом, для значительной части предсказанных экспортируемых белков бактерий исследуемой группы функциональная принадлежность не установлена, поэтому с помощью ресурса CAZy (<http://www.cazy.org/>) до-

полнительно в геномах идентифицировали гены ферментов, участвующих в синтезе, метаболизме и распознавании сложных углеводов. В таблице представлены предсказанные у бактерий группы *B. pumilus* секретируемые деполимеразы сложных углеводов, которые могут играть значимую роль в деградации растительных клеток.

Таблица

Кодирующие последовательности геномов бактерий группы *B. pumilus*, предсказанные как секретируемые деполимеразы сложных углеводов

Предсказанный фермент	Локус в геномной последовательности штамма				
	11-1-1	63-2-2	БИМ В-171	33.4	F6
Целлюлаза	HRJ37_08510	JNE42_08535	LG951_08295	N7921_08910	JNE45_08115
Эндо-1,4-β-ксилаза	HRJ37_09580	JNE42_09395	LG951_09175	N7921_09970	JNE45_09130
Арабинофураноза	HRJ37_09585	JNE42_09400	LG951_09180	N7921_09975	JNE45_09135
Пектинэстераза	HRJ37_09895	JNE42_09700	LG951_09475	N7921_10315	JNE45_09475
Эндо-1,4-β-ксилаза	HRJ37_09990	JNE42_09805	LG951_09545	N7921_10410	JNE45_09570
Пектатлиаза	HRJ37_18940	JNE42_18135	LG951_18630	N7921_18715	JNE45_17925
Пектатлиаза	HRJ37_19010	JNE42_18205	LG951_18705	N7921_18790	JNE45_17995
Эндогалактаназа	HRJ37_19515	JNE42_18710	LG951_19180	N7921_19265	JNE45_18465

Как следует из таблицы, гены ферментов, участвующих в разрушении полисахаридов растительной клетки, найдены в геномах всех исследуемых штаммов. Среди аннотированных с помощью CAZy белок-кодирующих последовательностей только целлюлозосвязывающий белок экспансин, который не является гидролазой, отсутствует у непатогенного штамма *B. safensis* F6. Гены экспансинов выявлены у ряда фитопатогенных и свободноживущих бактерий, есть доказательства участия данных белков в патогенезе [Expansin-like Ex11 ... , 2020], однако у проявляющего фитопатогенные свойства *B. safensis* 33.4 отсутствует ортолог данного гена. Таким образом, сравнительный анализ гипотетически секретируемых белков штаммов бактерий *B. pumilus* не выявил значимых отличий секретомов вирулентных штаммов и не проявляющего фитопатогенные свойства штамма *B. safensis* F6. Подтверждение полученных с помощью биоинформатического анализа данных проводили с помощью физиологических тестов. На рисунке представлены результаты исследования активности целлюлаз и пектатлиаз штаммов бактерий группы *B. pumilus*.

На основании полученных результатов можно заключить, что исследованные штаммы бактерий группы *B. pumilus* не отличаются по набору предсказанных секретируемых деполимераз, участвующих в разрушении растительной клетки. Активность целлюлаз и пектатлиаз характерна для патогенных *B. altitudinis* 11-1-1 и 63-2-2, *B. pumilus* БИМ В-171, *B. safensis* 33.4 и непатогенного штамма *B. safensis* F6.

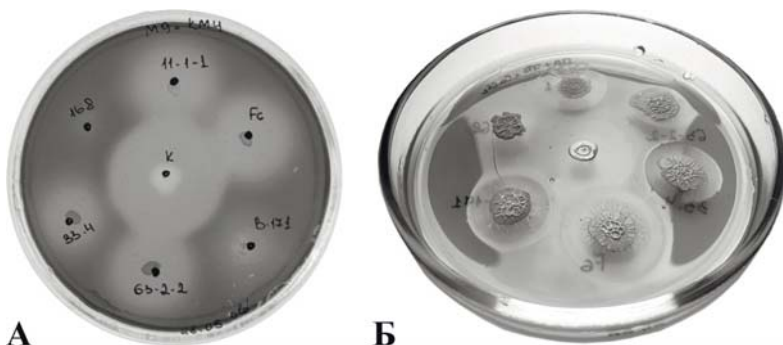


Рис. Результат тестирования целлюлолитической (А) и пектолитической (Б) активности штаммов *B. pumilus*

Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ Б24-095.

Литература

- Elbanna K., Elnaggar S., Bakeer A. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a New Causative Agent of Bacterial Soft Rot // *J. Phytopathol.* 2014. Vol. 162, N 11–12. P. 712–722.
- First Report of *Bacillus pumilus* Causing Trunk Bulges of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) in Malaysia / S. Mazlan, D. Zulperi, A. Wahab [et al.] // *Plant Dis.* 2019. Vol. 103, N 5. Art. 1016.
- Expansin-like Ex11 from *Pectobacterium* is a virulence factor required for host infection, and induces a defence plant response involving ROS, and jasmonate, ethylene and salicylic acid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* / D. A. Narváez-Barragán, O. E. Tovar-Herrera, M. Torres [et al.] // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, N 1. Art. 7747.
- Characterisation of Pectinolytic *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus amyloлитicus* Strains, New Pathogens of Potato in Tunisia / A. Yahyaoui, M. Oueslati, A. Motyka-Pomagruk [et al.] // *Agriculture.* 2023. Vol. 13, N 6. Art. 1275.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА АЭРОБНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ ПХБ

Д. О. Егорова, Т. Д. Кирьянова, Н. А. Королев

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского ФИЦ УрО РАН, Пермь, daryao@rambler.ru

Проблема очистки окружающей среды от загрязнения полихлорированными бифенилами (ПХБ) (группа Стойких органических загрязнителей), а также утилизации отработанных промышленных смесей ПХБ не теряет своей актуальности на протяжении нескольких десятилетий [Final act of ... , 2001]. Многочисленными исследованиями показано, что наиболее перспективным с экономической и экологической позиций является биологический метод деструкции ПХБ, а именно применение для данных целей аэробных бактериальных штаммов [Štrédlová, Cajthaml, 2022]. В случае аэробной биодеградации исходные молекулы ПХБ в результате

последовательного окисления трансформируются до (хлор)пентадиеновой и (хлор)бензойной кислот [Pieper, 2005]. Данные вещества характеризуются меньшей степенью опасности для окружающей среды и живых организмов, и утилизируются широким спектром бактерий до углекислого газа и воды. Ключевой реакцией процесса биодеструкции ПХБ является первая стадия окисления, которая катализируется ферментами группы диаоксигеназ. В большинстве случаев – бифенил 2,3-диоксигеназой (БДО). Показано, что способность аэробных бактерий окислять широкий спектр конгенов ПХБ, обусловлена разнообразием в нуклеотидной последовательности гена *bphA*, несущего информацию о строении отдельных участков α -субъединицы БДО [Pieper, 2005].

Цель проведенного исследования – изучить особенности строения гена *bphA* новых штаммов-деструкторов полихлорированных бифенилов.

В исследовании использованы 20 штаммов аэробных бактерий, принадлежащих родам *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, выделенных из экоценозов с различным типом и уровнем химического загрязнения. Показано, что все 20 штаммов проявляют высокую активность в отношении монохлорированных бифенилов. Для изучения строения гена *bphA* использованы 4 пары праймеров, позволяющие амплифицировать как консервативный участок гена, так и переменный [Baldwin Nakatsu, Nies, 2003; Шумкова, Плотникова, 2013].

Положительная амплификация с использованием пары праймеров F409R900 была получена с ДНК 4 штаммов (рис. 1).

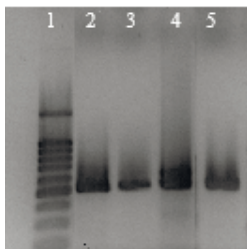


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *bphA*, кодирующего α -субъединицу бифенил диоксигеназы: 1 – молекулярный маркер O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Lithuania), 2 – штамм *Rhodococcus* sp. Osa8, 3 – штамм *Rhodococcus* sp. Osa11, 4 – *Stenotrophomonas* sp. Osa13, 5 – штамм *Rhodococcus* sp. Osa29

Установлено, что наибольший уровень сходства нуклеотидной последовательности гена *bphA* штаммов *Rhodococcus* sp. Osa8, *Rhodococcus* sp. Osa11 и *Rhodococcus* sp. Osa29 с геном *bphA* известных штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus* составил 95,1–97,06 %. При построении дендрограммы установлено, что гены *bphA* данных штаммов формируют отдельную ветвь (рис. 2).

Анализ данных показал, что скорость деструкции монохлорированных бифенилов у штаммов *Rhodococcus* sp. Osa8, *Rhodococcus* sp. Osa11 и *Rhodococcus* sp. Osa29 выше, чем у ряда штаммов, представленных на рис. 2. Можно предположить, что высокая деструктивная активность исследуемых штаммов обусловлена уникальной нуклеотидной последовательностью α -субъединицы БДО.

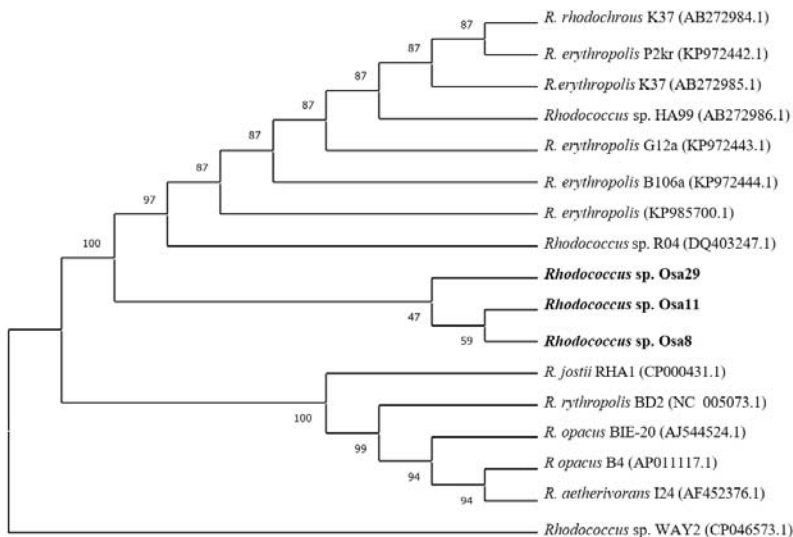


Рис. 2. Дерево сходства выявленных генов с известными генами α -субъединицы бифенил 1,2-диоксигеназы, построенное методом UPGMA. Масштаб соответствует 10 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов. «Bootstrap»-анализ проведен на 1000 повторностях. Значения рядом с «ветвями» показывают вероятность расположения последовательностей в данных группах. Жирным шрифтом выделены нуклеотидные последовательности, исследуемые в настоящей работе

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 24-24-00498.

Литература

Шумкова Е. С., Плотникова Е. Г. Олигонуклеотидные праймеры для детекции генов, кодирующих большую субъединицу бифенил 2,3-диоксигеназы, бактерий порядка *Actinomycetales* // Вестник Пермского ун-та. Серия: Биология. 2012. № 1. С. 34–40.

Baldwin B. R., Nakatsu C. H., Nies L. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69, N 6. P. 3350–3358.

Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm, 22–23 May // UNEP / POPS/CONF/4. United Nations Environment Programme. Geneva. 2001. 44 p.

Pieper D. H. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. Vol. 67, N 2. P. 170–191.

Šrédlová K., Cajthaml T. Recent advances in PCB removal from historically contaminated environmental matrices // Chemosphere. 2022. Vol. 287. Art. 132096.

ПРОДУКЦИЯ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ ШТАММОМ *WEIZMANNIA COAGULANS* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НАЧАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ГЛЮКОЗЫ

Н. Л. Ертилецкая^{1,2}, А. А. Суханова¹, А. Н. Бояндин^{1,2}

¹Сибирский государственный университет науки и технологий
им. М. Ф. Решетнева, Красноярск, info@sibsau.ru

²Институт биофизики СО РАН, Красноярск, fic@ksc.krasn.ru

Производство молочной кислоты гомоферментативными молочнокислыми бактериями происходит по пути Эмбдена-Майергофа-Парнаса, в котором исходным субстратом является глюкоза. Глюкоза может попадать в бактериальную клетку напрямую из среды посредством диффузии через клеточную мембрану, либо опосредованно в результате превращений других сахаров (лактоза, мальтоза, целлобиоза и др.) [Abdel-Rahman, Tashiro, Sonomoto, 2013]. Однако, несмотря на возможность использования самых разных субстратов, в числе которых растительные отходы сельского хозяйства, в условиях промышленного производства глюкоза все еще остается самым часто используемым.

Разные виды продуцентов молочной кислоты обладают различной толерантностью к концентрациям глюкозы в среде. Во время культивирования продуцентов молочной кислоты, осмотическое давление, вызванное глюкозой, повышается из-за избыточных источников углерода, что приводит к задержке роста клеток и низкой эффективности производства [Kinetic characteristics ... , 2020; Modelling the influence ... , 1998].

Исследование влияния различных концентраций глюкозы на рост и продуктивность *Weizmannia coagulans* (штамм выделен в СибГУ им. М. Ф. Решетнева, на стадии патентования) проводили в колбах ($n = 3$), содержащих 100 мл бульона МС1 (триптон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 1 г/л, глюкоза – 20–120 г/л) в шейкере-инкубаторе при 50 °С и 150 об/мин в течение 56 ч. Для экспериментальных групп различалась начальная концентрация глюкозы в среде – 20, 50, 70, 100 и 120 г/л. После засева и во время культивирования из колб отбирали по 1 мл среды для подсчета клеток, определения глюкозы, молочной кислоты и оптической плотности ранее описанными методами [Исследование характеристик ... , 2023]. В качестве нейтрализующего агента использовали мел в количестве 10 % (10 г). По результатам культивирования определили и сравнили средние значения потребления субстрата и производства молочной кислоты, продуктивность процесса, изменение концентрации клеток и конверсию.

По результатам культивирования нового штамма *W. coagulans* при различных начальных концентрациях глюкозы установлено, что при начальных концентрациях глюкозы 20, 50, 70, 100 и 120 г/л за 56 ч культивирования средние значения выхода молочной кислоты составили 54,1; 57,4; 52,1; 67,1 и 62,2 г/л, соответственно (рис.).

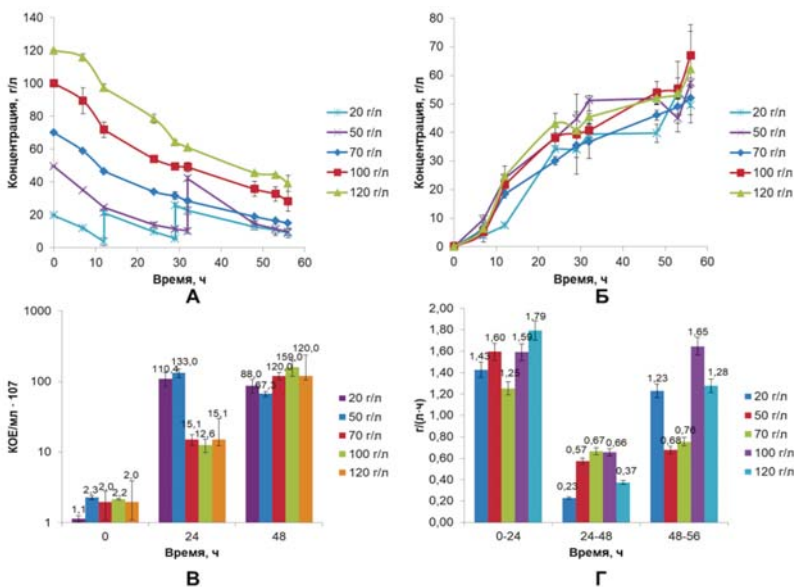


Рис. Результаты культивирования штамма *W. coagulans* при различных начальных концентрациях глюкозы:

А – потребление глюкозы, Б – выход молочной кислоты, В – изменение концентрации клеток, Г – изменение продуктивности в различные промежутки времени

Суммарное потребление глюкозы за все время культивирования отличалось и составило 55,6; 72,0; 53,0; 71,7 и 70,1 г/л глюкозы, с конверсией 97,2; 79,7; 94,4; 93,6 и 88,8 %, соответственно. Значения продуктивности культуры в различные промежутки времени отличались. Например, за первые 24 ч наибольшая продуктивность 1,79 г/(л·ч) отмечена при концентрации глюкозы 120 г/л в среде. В последующие 24 ч продуктивность в данной экспериментальной группе резко снизилась в 4,8 раз, при этом в экспериментальных группах с начальной концентрацией глюкозы 50, 70 и 100 г/л она была выше почти в два раза, а в группе 20 г/л – ниже на 0,14 г/(л·ч). Концентрация клеток в среде через 24 ч от начала культивирования значительно повысилась (в 60–100 раз) при более низких концентрациях глюкозы (20 и 50 г/л), в то время как при концентрациях 70, 100 и 120 г/л этот показатель вырос всего в 6–8 раз. Однако через 48 ч от начала культивирования для всех групп концентрация клеток была относительно на одном уровне. Данный результат показывает, что повышенное содержание глюкозы в среде ингибирует рост бактерий. Когда концентрация глюкозы в колбах групп с ее повышенным содержанием снизилась до уровня групп с пониженным содержанием глюкозы, численность клеток увеличилась.

Полученные результаты показывают, что данный штамм *W. coagulans* не ингибируется высокими концентрациями глюкозы, а, напротив, демонстрирует большую продуктивность при концентрации глюкозы в среде 100–120 г/л. Более того, ферментация в таких условиях позволяет обойтись без дополнительных подпиток субстратом, что снижает трудозатратность процесса.

Исследование выполнено в рамках проекта № FEFE-2024-0027 «Исследование закономерностей химико-биотехнологического синтеза био-разлагаемых полимеров и разработка комплексной технологии получения конструкционных композитных материалов с контролируемыми сроками биодegradации для промышленного применения», поддержанного Министерством науки и высшего образования РФ.

Литература

Исследование характеристик роста штаммов-продуцентов молочной кислоты с использованием глюкозного сиропа в качестве источника углерода / А. А. Суханова, Н. Л. Ертылецкая, А. Н. Бояндин [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13, № 2 (45). С. 245–254.

Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes // Biotechnology advances. 2013. Vol. 31, N 6. P. 877–902.

Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LRFb) l-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain / F. Zhang, J. Liu, X. Han [et al.] // Engineering in Life Sciences. 2020. Vol. 20, N 12. P. 562–570.

Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour / C. Åkerberg, K. Hofvendahl, G. Zacchi, B. Hahn-Hägerdal // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 49. P. 682–690.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ГЛУТАМИОНА У ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* С МНОЖЕСТВЕННОЙ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТЬЮ ПРИ ДЕЙСТВИИ ХЛОРАМФЕНИКОЛА

**Н. С. Жуланова^{1,2}, А. В. Тюленев¹, Г. В. Смирнова¹,
О. Н. Октябрьский¹**

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, leksey333@yandex.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, nata.zhulanova02@mail.ru

Рост числа бактериальных штаммов, обладающих множественной антибиотикоустойчивостью (MDR) становится серьезной проблемой современной медицины и ветеринарии. Возрастает необходимость как в поиске новых препаратов, так и в разработке подходов, позволяющих более эффективно использовать существующие антибиотики. Актуально исследование механизмов возникновения резистентности у микроорганизмов.

Известно, что низкомолекулярные тиолы, в частности глутатион (GSH), принимают активное участие в адаптации к многим неблагоприятным факторам, таким как окислительный стресс и действие антибиотиков [Meister, Anderson, 1983; Smirnova, Oktyabrsky, 2005]. Глутатион в клетке выступает в роли основного редокс-буфера и принимает участие в регуляции многих редокс-чувствительных белков и глобальных стрессовых регуляторов [Hidalgo, Demple, 1996]. Кроме того, известно, что в аэробных культурах *E. coli*, глутатион непрерывно циркулирует между цитоплазмой и окружающей средой [Smirnova Muzyka, Oktyabrsky, 2012]. Предполагается, что благодаря трансмембранной циркуляции, глутатион может выполнять регуляторные и протекторные функции.

Объект исследования – штаммы *E. coli* № 29 (L-5859), № 43 (L-5874), возбудители птичьего коллибациллеза, выделенные из внутренних органов цыплят-бройлеров птицефабрик Пермского края. Штаммы депонированы в международной микробной коллекции университета Любляны (Словения) и обладают устойчивостью к ампициллину, ципрофлоксацину, канамицину и стрептомицину, однако чувствительны к действию хлорамфеникола. Культуры бактерий выращивались на среде M9 [Miller, 1972] с 0,2 % глюкозы в колбах на 250 мл в термостатируемом орбитальном шейкере (37°C, 150 об/мин). Уровни внутри и экстраклеточного глутатиона определяли с помощью модифицированного метода Титца [Tietze, 1969], основанного на взаимодействии GSH с реагентом Элмана (DTNB) с образованием окрашенного продукта, поглощающего в области 412 нм. Окисляющийся в ходе этой реакции глутатион вновь восстанавливается до GSH глутатионредуктазой (GOR) в присутствии НАДФН. Оптическую плотность (OD₆₀₀) и удельную скорость роста (μ) определяли традиционными способами.

В контрольных условиях, у обоих штаммов уровни экстраклеточного глутатиона поддерживались на постоянном уровне до OD₆₀₀ = 1,4, затем отмечалась его аккумуляция в среде, что может быть связано с переходом культуры к микроаэробным условиям роста. Примечательно, что базовые значения уровня внеклеточного GSH (0,93±0,14 мкМ/OD₆₀₀) у штамма L-5859 были в 1,9 раза ниже по сравнению с L-5874 (0,48±0,08 мкМ/OD₆₀₀). Вначале культивирования уровень внутриклеточного GSH, у штамма № 29 был в 1,7 раз выше (9,88±0,88 мкМ/OD₆₀₀), чем у № 43 (5,75±0,22 мкМ/OD₆₀₀), однако к окончанию эксперимента их значение не отличалось.

Бактерии обрабатывались 25 мкг/мл хлорамфеникола в середине экспоненциальной фазы роста (OD₆₀₀ = 0,4). Через 15 мин после начала обработки отмечалось необратимое снижение удельной скорости роста (μ) у обоих штаммов с 0,95±0,04 до 0,55±0,02 ч⁻¹, а через 120 мин экспозиции рост бактерий прекращался.

После внесения хлорамфеникола, уровни экстраклеточного глутатиона возрастали до $20,2 \pm 1,14$ и $47,1 \pm 4,2$ мкМ/OD₆₀₀ у штаммов № 29 и № 43 соответственно. Одновременно, в первые 15 мин после обработки отмечалось некоторое повышение уровня внутриклеточного GSH, сменяющееся в дальнейшем снижением до минимальных значений ($14,6 \pm 1,05$ и $10,8 \pm 2,1$ мкМ/OD₆₀₀ до $1,17 \pm 0,12$ и $1,7 \pm 0,3$ мкМ/OD₆₀₀ у штаммов № 29 и № 43 соответственно), что может указывать на значительное усиление экспорта GSH из цитоплазмы в среду культивирования. Примечательно, что в наших ранних исследованиях при воздействии хлорамфеникола на непатогенные культуры *E. coli* BW25113, не обладающие антибиотикорезистентностью, не наблюдалось значительного снижения уровня внутриклеточного пула глутатиона [Cysteine homeostasis ... , 2019].

Таким образом, при действии хлорамфеникола на бактерии *E. coli*, обладающие MDR, наблюдаются значительные изменения как внутриклеточного, так и экстраклеточного уровня GSH, что может быть связано с изменением его трансмембранных потоков.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-14-00093.

Литература

- Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells. / G. V. Smirnova, A. V. Tyulenev, K. V. Bezmaternykh [et al.] // *Amino Acids*. 2019. Vol. 51. P. 1577–1592.
- Hidalgo E., Demple B. Adaptive responses to oxidative stress: the *soxRS* and *oxyR* regulons // Regulation of gene expression in *Escherichia coli*. 1996. P. 435–452.
- Meister A., Anderson M. E. Glutathione // *Ann. Rev. Biochem.* 1983. Vol. 52. P. 711–760.
- Miller J. H. Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972. 466 p.
- Smirnova G. V., Muzyka N. G., Oktyabrsky O. N. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells // *Microbiol. Res.* 2012. Vol. 167. P. 166–172.
- Smirnova G. V., Oktyabrsky O. N. Glutathione in bacteria // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. P. 1199–211.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // *Anal. Biochem.* 1969. Vol. 27. P. 502–522.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕСТРУКТОРОВ ПАЛЬМОВОГО МАСЛА ИЗ ЖИДКИХ ОТХОДОВ ПРЕДПРИЯТИЙ ПО ПЕРЕРАБОТКЕ МАСЛИЧНОЙ ПАЛЬМЫ

Д. А. Ивасенко¹, А. Н. Сысоева¹, А. А. Трифонов¹, Э. Нурхайати²,
А. Й. Багастьо², Б. В. Тангаху², И. Вармадеванти²,
А. Л. Герасимчук⁸¹

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет
Томск, ivasenko.da@mail.ru

²Технологический институт Sepuluh Nopember (ITS), Сурабая, Индонезия
ervin@enviro.its.ac.id

Пальмовое масло широко используется во всём мире. Увеличивающееся с каждым годом производство пальмового масла связано с образованием большого количества отходов. Сточные воды производства пальмового масла характеризуются высоким содержанием разнообразных загрязняющих веществ и стойким неприятным запахом. Прямой сброс таких стоков в окружающую среду без надлежащей очистки может вызвать серьезные экологические проблемы. Использующиеся в настоящее время очистные сооружения для жидких отходов производства пальмового масла не справляются с очисткой и разложением вредных органических загрязнителей и приводят к долгосрочным экологическим проблемам, включая выбросы парниковых газов [Dominic, Baidurah, 2018]. В связи с этим актуальным является усовершенствование имеющихся и разработка новых биотехнологий очистки, а также поиск и изучение новых штаммов-деструкторов отходов производства пальмового масла.

В сентябре 2023 г проведено натурное обследование системы прудов-накопителей на территории предприятия по производству пальмового масла PT Agro Indomas (Восточный Калимантан, Индонезия), которое с 1987 г занимается выращиванием плантаций масличных пальм и производством сырого пальмового масла. Поступающие с предприятия в первый пруд-накопитель сточные воды (температура достигает 50 °С) содержат большое количество масла, которое концентрируется в верхнем слое сточных вод (20–30 см). На этом этапе происходит охлаждение стоков до температуры окружающей среды, далее стоки последовательно перемещаются во второй (поверхность покрыта затвердевшей коркой) и третий пруды-накопители и затем используются для орошения сельскохозяйственных плантаций.

Отбор проб произведен в трех разных сайтах из системы прудов-накопителей. Результаты физико-химического анализа проб отходов показали, что густая масса, отобранная с поверхности первого пруда-накопителя, характеризовалась высоким содержанием масла (измеренная массовая доля жира составила 89,5 %) и слабощелочным значением рН 4,1. Массовая доля общего азота и фосфора составила 0,28±0,06 % и

0,43±0,08 %, соответственно. Сульфат-ион и сера обнаружены в следовых количествах. В жидких пробах второго и третьего прудов-накопителей, представляющих темную жидкость с запахом сероводорода, обнаружены высокие показатели ХПК (2530 и 2366 мг/л, соответственно) и БПК (1284 и 1201 мгО₃/л, соответственно), что свидетельствует о высокой степени загрязнения органическими веществами. Показатели аммонийного азота составили 273 и 208 мг/л, нитритного азота – 0,15±0,023 и 0,05±0,011 мг/л, нитрата – 15,8±3,5 и 11,2±2,5 мг/л, сульфата – 38,1±4,7 и 7,7±1,0 мг/л соответственно. Следует отметить невысокое содержание сульфатов несмотря на активный запах сероводорода и визуальные признаки присутствия сульфидов в пробах воды. Это может быть следствием активных процессов сульфатредукции, при которых сульфат не накапливается, а используется микроорганизмами в качестве акцептора электронов с образованием сероводорода.

Пробы отходов из трех прудов-накопителей были использованы для получения жидких накопительных культур на минеральной среде с добавлением 10 % пальмового масла. Полученные накопительные культуры были использованы в качестве инокулята для дальнейших пересевов на селективные плотные питательные среды методом разведений для получения отдельных колоний и выделения чистых культур.

Всего получено 13 изолятов. По результатам филогенетического анализа близких к полным последовательностей 16S рРНК установлено, что среди полученных изолятов есть представители условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Pseudomonas aeruginosa* и *Alcaligenes faecalis*, которые были исключены из дальнейших исследований. Изоляты, идентифицированные как *Stutzerimonas stutzeri*, не относятся к утвержденному перечню патогенов, однако для ряда штаммов этого вида известна патогенность для человека [Biology of *Pseudomonas stutzeri*, 2006]. Из-за близкого родства с условно-патогенными микроорганизмами данные штаммы также были исключены из дальнейшей работы. Штамм ПН1–2Т2 показал 100 % сходство с последовательностью гена 16S рРНК некультивируемой бактерии из осадка городских сточных вод (номер доступа GeneBank KC597267) и 99,92 % сходства с типовыми видами рода *Bacillus*, а именно *B. tequilensis* и *B. subtilis*, близкородственных грамположительных спорообразующих бактерий, для которых показана антагонистическая активность для фитопатогенных грибов [Isolation and characterization ... , 2020].

Таким образом, из изолятов, выделенных из прудов-накопителей, получающих стоки отходов от производства пальмового масла, для дальнейших исследований подходил *Bacillus* sp. ПН1–2Т2. Штамм рос на диагностической среде для липофильных бактерий (трибутириновый агар) и образовывал зоны гидролиза вокруг колоний 1–2 мм, что свидетельствует о продукции внеклеточных липаз/эстераз. Однако несмотря на наличие липолитических свойств, *Bacillus* sp. ПН1–2Т2 не показал эффективной утилизации пальмового масла в лабораторных условиях. Максимальная

численность клеток при росте на жидкой среде с пальмовым маслом (1 %) не превышала $6,7 \cdot 10^7$ кл/мл, визуального гидролиза пальмового масла при этом не происходило. Многие представители рода *Bacillus* известны своей способностью к деструкции широкого круга органических веществ, включая различные липиды и липид-содержащие соединения. Для определения метаболического потенциала выделенного нами штамма *Bacillus* sp. ПН1–2Т2 необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта № 075-15-2022-1152.

Литература

Biology of *Pseudomonas stutzeri* / J. Lalucat, A. Bennisar, R. Bosch [et al.] // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. Vol. 70, N 2. P. 510–547.

Dominic D., Baidurah S. Recent developments in biological processing technology for palm oil mill effluent treatment – A review // Biology. 2022. Vol. 11. Art. 525.

Isolation and characterization of root-associated bacterial endophytes and their biocontrol potential against major fungal phytopathogens of rice (*Oryza sativa* L.) / M. A. Khaskheli, L. Wu, G. Chen [et al.] // Pathogens. 2020. Vol. 9. Art. 172.

УРОВЕНЬ ЦИСТЕИНА И ГЛУТАТИОНА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ ПО СУЛЬФАТУ

Т. В. Калашникова¹, Л. В. Сутормина¹, Г. В. Смирнова¹,
О. Н. Октябрьский¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, tatyana-kalashnikova22@yandex.ru

Цистеин входит в состав белков и глутатиона и является источником восстановленной серы для многих других органических молекул. Благодаря высокой окислительно-восстановительной активности сульфгидрильных групп он играет важную роль в регуляции активности ферментов, передаче сигналов, антиоксидантной защите и других метаболических процессах. Однако высокие концентрации цистеина в цитоплазме опасны для клеток, так как, восстанавливая железо, он увеличивает пул Fe^{2+} , который, взаимодействуя с H_2O_2 , образует высокотоксичные гидроксильные радикалы в ходе реакции Фентона. Кроме того, даже субтоксические концентрации цистеина могут подавлять активность некоторых ферментов, участвующих в синтезе аминокислот, нарушая рост бактерий [Korshunov, Imlay, Imlay, 2020; Park, Imlay, 2003]. Чтобы избежать этих негативных последствий, бактериальные клетки должны строго регулировать уровень цистеина. Одним из механизмов регуляции гомеостаза цистеина является его встраивание в молекулу глутатиона, который образован тремя аминокислотами: цистеином, глутаминовой кислотой и глицином и выступает как буфер цистеина [Smirnova, Oktyabrsky, 2019]. Глутатион совместно с глутаредоксинами образует одну из основных антиок-

сидантных систем в клетках эукариот и граммотрицательных бактерий, которая помимо защиты от окислительного стресса выполняет множество функций (регуляция сигнальных путей, активности ферментов, транспорта ионов и др.) [Smirnova, Oktyabrsky, 2005]. Цистеин – это серосодержащая аминокислота, поэтому его биосинтез зависит от наличия и источника серы, роль которого в минимальной среде играет сульфат. Уровень глутатиона, в свою очередь, зависит от концентрации цистеина, поскольку цистеин является лимитирующим компонентом при его синтезе. Целью данной работы являлось изучение изменений уровней цистеина и глутатиона при культивировании *E. coli* в условиях голодания по сульфату.

Объектом исследования служил штамм *E. coli* BW25113 из коллекции Keio. Бактерии выращивали на минимальной среде M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 15,13 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, NaCl – 0,5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,246 г/л, CaCl_2 – 0,011 г/л) с глюкозой (0,2 %). При голодании по сульфату MgSO_4 в среде M9 заменяли на MgCl_2 (0,203 г/л). Ночную культуру, выращенную на среде с сульфатом, разбавляли в 100 мл среды без сульфата до начальной OD_{600} около 0,2 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37 °C, 150 об/мин). Отбор проб для определения GSH и цистеина производили каждые 30 мин с момента переноса культуры в среду без сульфата. Удельную скорость роста клеток вычисляли по формуле: $\mu = \Delta \ln \text{OD}_{600} / \Delta t$. Глутатион измеряли высокочувствительным спектрофотометрическим циклическим методом, используя реагент дитионитробензоат (DTNB) и глутатионредуктазу [Tietze, 1969]. Цистеин определяли по методу Gaitonde [Gaitonde, 1967].

После переноса культуры в среду без сульфата клетки продолжали поддерживать рост в течение 60 мин, после чего удельная скорость роста начинала снижаться и достигала нулевых значений через 120 мин, что свидетельствует об исчерпании следовых количеств сульфата. Время прекращения роста культуры (60 мин) было принято за начало голодания. Через 90 мин после начала голодания в среду вносили источник серы в виде 15 μM цистина или 1 мМ Na_2SO_4 . После внесения источника сульфата в среду наблюдалось возобновление роста культуры. При этом в случае цистина резкий подъем скорости роста в течение первых 60 мин после его добавления сменялся замедлением роста.

Уровень внутриклеточного цистеина (Cys_{in}) в момент начала голодания составлял $0,117 \pm 0,008 \mu\text{M} / \text{OD}_{600}$. Через 30 мин голодания концентрация Cys_{in} снижалась в 1,5 раза, после чего поддерживалась на постоянном уровне. Внесение в среду культивирования цистина (окисленная форма цистеина) вызывало резкий подъем внутриклеточного цистеина до концентраций в 2 раза превышающих его начальный уровень ($0,220 \pm 0,014 \mu\text{M} / \text{OD}_{600}$). При добавлении в среду сульфата натрия наблюдалось менее выраженное повышение Cys_{in} , до $0,179 \pm 0,005 \mu\text{M} / \text{OD}_{600}$. Повышение Cys_{in} в ответ на добавление источника серы имело обратимый характер. Через 60 мин после добавления сульфата концентрация внутри-

клеточного цистеина снижалась и выходила на уровень, характерный для нормальных условий роста на сульфатной среде M9.

Уровень внутриклеточного глутатиона (GSH_{in}) также снижался на протяжении культивирования в условиях истощения сульфата. На начальных этапах голодания уровень GSH_{in} составлял $0,651 \pm 0,217 \mu\text{M}/OD_{600}$. К моменту внесения источников сульфата концентрация глутатиона достигала почти нулевых значений. Добавление цистина или Na_2SO_4 способствовало быстрому увеличению количества GSH в клетках, одновременно с подъемом уровня цистеина и увеличением скорости роста. При этом внесение цистина вызывало более резкое повышение GSH_{in} , чем сульфат. Через 30 мин концентрация глутатиона поднималась до уровня, в 4 раза, превышающего начальный (до наступления голодания), и составляла $8,65 \pm 0,90 \mu\text{M}/OD_{600}$. В дальнейшем концентрация глутатиона возвращалась к исходному уровню. Добавление Na_2SO_4 вызывало более медленное, чем при цистине, увеличение концентрации глутатиона. Через 30 мин количество глутатиона возрастало до $5,40 \pm 0,04 \mu\text{M}/OD_{600}$, в дальнейшем его уровень повышался еще на 13 %. Более резкий подъем внутриклеточной концентрации цистеина и глутатиона при добавлении цистина, чем при внесении Na_2SO_4 , свидетельствуют о предпочтительном использовании транспорта цистина в отличие от биосинтеза цистеина из сульфата. Однако при импорте цистина возникает большой избыток внутриклеточного цистеина, следствием чего является негативное воздействие на метаболизм и двукратное замедление роста бактерий по сравнению с добавлением сульфата.

Таким образом, голодание по сульфату приводит к значительному снижению концентраций цистеина и глутатиона в клетках, а добавление источников серы сопровождается нарушением гомеостаза цистеина, которое сильнее выражено в случае цистина, чем сульфата.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

Литература

- Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells / G. V. Smirnova, A. V. Tyulenev, K. V. Bezmaternykh [et al.] // *Amino Acids*. 2019. Vol. 51. P. 1577–1592.
- Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // *Biochem. J*. 1967. Vol. 104. P. 627–633.
- Korshunov S., Imlay K. R. C., Imlay J. A. Cystine import is a valuable but risky process whose hazards *Escherichia coli* minimizes by inducing a cysteine exporter // *Mol. Microbiol*. 2020. Vol. 113. P. 22–39.
- Park S., Imlay J. A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // *J. Bacteriol*. 2003. Vol. 185. P. 1942–1950.
- Smirnova G. V., Oktyabrsky O. N. Glutathione in bacteria // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. P. 1199–1211.
- Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // *Anal. Biochem*. 1969. Vol. 27. P. 502–522.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ СТРУКТУРНЫХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ: МОЛЕКУЛЯРНО-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

А. А. Камнев

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»
Саратов, a.a.kamnev@mail.ru; aakamnev@ibppm.ru

Ввиду широкого использования микробных препаратов в различных областях биотехнологии (в частности, в составе биоудобрений в агробиотехнологии; для осуществления биоремедиации и фиторемедиации загрязненных почв и водоемов; в медицинских и пищевых технологиях и проч.) важным аспектом является их сохранность при хранении (в основном в сухом или замороженном состоянии). Для контроля сохранности и выяснения возможных причин её снижения с целью оптимизации условий хранения необходим анализ состава микробной клеточной биомассы на молекулярном уровне и мониторинг его изменений *in vivo* (в живой биомассе), что является нетривиальной задачей. Для её осуществления в научных исследованиях, посвященных микробной биотехнологии, в последние десятилетия всё большее применение получили современные методы молекулярной спектроскопии. В настоящем докладе будут рассмотрены примеры использования мёссбауэровской (ядерной гамма-резонансной, ЯГР) спектроскопии для контроля редокс-превращений клеточного железа [Камнев, Тугарова, 2021], одного из важнейших микроэлементов, в процессах его ассимиляции различными видами бактерий, имеющих существенный агробиотехнологический потенциал, и при приготовлении высушенных препаратов клеточных биомасс [Diffuse reflectance ... , 2020]. Контроль биомакромолекулярного состава и структурных особенностей клеточных компонентов при этом может быть осуществлён с помощью инфракрасной фурье-спектроскопии (ИКФС) – одного из наиболее широко используемых современных инструментальных методов, что обусловлено его высокой информативностью, чувствительностью и относительной простотой проведения измерений [Камнев, Тугарова, 2023; Fourier transform ... , 2023].

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 24-26-00209).

Литература

Камнев А. А., Тугарова А. В. Биоаналитические применения мёссбауэровской спектроскопии // Успехи химии. 2021. Т. 90, № 11. С. 1415–1453.

Камнев А. А., Тугарова А. В. Особенности методологии инфракрасной фурье-спектроскопии и интерпретации спектроскопических данных при анализе микробиологических объектов // Журнал аналитической химии. 2023. Т. 78, № 10. С. 914–928.

Diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) and Mössbauer spectroscopic study of *Azospirillum brasilense* Sp7: Evidence for intracellular iron(II) oxidation in bacterial biomass upon lyophilisation / A. A. Kamnev, A. V. Tugarova, A. G. Shchelochkov [et al.] // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2020. Vol. 229. Art. 117970.

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245: Aspects of methodology and matrix composition / A. A. Kamnev, Yu. A. Dyatlova, O. A. Kenzhegulov [et al.] // Molecules. 2023. Vol. 28. Art. 1949.

ПРОИЗВОДНЫЕ ПЯТИЧЛЕННЫХ *O*- И *N*-ГЕТЕРОЦИКЛОВ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ГРИБКОВОЙ МИКРОФЛОРЫ НА РАЗЛИЧНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ

**С. В. Колышкина¹, Д. А. Новичихина¹, Е. Ю. Трзина¹,
С. А. Лисовская², А. М. Хабибрахманова¹, Л. З. Латыпова¹,
А. Р. Курбангалиева¹, А. Р. Каюмов¹**

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань,
milogreen1009@gmail.com

²Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии, Казань, S_lisovskaya@mail.ru

Воздействие плесени в зданиях признано пагубным фактором развития симптоматических аллергий и респираторных заболеваний, таких как астма. Среди грибов некоторые виды, например, меланизированные черные грибы, могут оказывать негативное воздействие на здоровье человека через контакт с кожей. Повышенная влажность в помещении в сочетании с использованием строительных материалов на биологической основе может легко способствовать росту плесени и распространению их спор в помещении. Наиболее распространённые плесневые грибы, встречающиеся на поверхностях, а в частности на строительных материалах, относятся к родам *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* и *Stachybotrys*. Заселяющая зерно грибковая патогенная флора существенно влияет на его семенные, технологические и санитарно-гигиенические свойства. Плесневение семян является серьезной проблемой для экономики, поскольку оно может приводить к снижению качества зерна и урожайности.

Целью работы является оценка эффективности различных производных *O*- и *N*-гетероциклов в предотвращении грибкового обрастания растений, семян и помещений для их хранения.

Исследованные соединения представляют собой галоген-, серо- и азотсодержащие производные 2(5*H*)-фуранонового ряда разного структурного типа – это тиозиферы, сульфоны, сульфоксиды, 1,2,3-триазолы и конденсированные бициклические соединения, несущие ненасыщенный γ -лактонный фрагмент. Производные фуранона проявляют различную биологическую активность, такую как антибактериальная, противогриб-

ковая, противовирусная, и, таким образом, могут использоваться в качестве ведущего средства в фармакологии.

В работе исследовали противогрибковую активность 250 производных фуранона, синтезированных сотрудниками лаборатории биофункциональной химии Химического института КФУ, в отношении микромицетов-колонизаторов поверхностей таких как *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Mucor* и *Alternaria alternata*. В результате было отобрано 35 соединений, показавших наибольшую активность в отношении исследуемых микромицетов.

На следующем этапе была проведена оценка цитотоксичности соединений. Наименьший цитотоксический эффект показали 6 веществ, которые представляют интерес в качестве потенциальных фунгицидных препаратов.

Далее выполнялось определение фитотоксичности веществ на пшенице двух сортов. Семена выращивали на фильтровальной бумаге, смоченной раствором исследуемых соединений в концентрации 4, 16 и 64 мкг/мл. Было установлено, что соединения P87 и A42 при концентрации 16 мкг/мл не ингибируют всхожесть ростков, и подавляют грибковую флору при прорастании. Соединение F199 не оказывало токсичного действия для растений, что проявлялось в виде длинных ростков.

Соединения, показавшие фунгицидную активность, были отобраны для оценки возможного синергетического действия с регулярными фунгицидами. В качестве модельного фунгицида был использован флуконазол, так как соединения азольного ряда часто используются для обработки растений и семян, а также строительных материалов. Эксперимент показал, что в присутствии некоторых производных фуранона концентрация флуконазола, необходимая для подавления роста грибов, может значительно снижаться. Например, в отношении *Aspergillus niger* для соединения A41 минимальная пороговая концентрация флуконазола снижается в 64 раза, а для гетероцикла F199 – в 32 раза. Также результаты в отношении *Fusarium solani* для соединений A41, A42, A43, F74, F75, F199, F215 и F217 показали, что минимальная пороговая концентрация флуконазола снижается более чем в 1000 раз.

Таким образом, исследуемые производные *O*- и *N*-гетероциклов показали перспективные результаты для подавления плесневых грибов. Кроме того, они могут быть использованы как возможные стимуляторы антимикробного эффекта наряду с классическими фунгицидами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-73-10182)

СОЗДАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

А. А. Крюков¹, А. П. Юрков¹, А. О. Горбунова¹, Т. Р. Кудряшова¹,
А. И. Горенкова²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, aa.krukov@arriam.ru, ap.yurkov@arriam.ru
a.gorbunova@arriam.ru, t.kudryashova@arriam.ru

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
nasty.a.gorenkova.2016@mail.ru

Арбускулярная микориза (АМ) является широко распространенным симбиозом, формируемым большинством наземных растений с грибами подотдела *Glomeromycotina*. Проблемой в изучении АМ-грибов является трудность их идентификации, в том числе генетической. Ряд видов АМ грибов сложно различим по морфологии. В то же время вопрос баркода для генетической идентификации АМ грибов до сих пор остается дискуссионным. Наиболее часто используемым для идентификации АМ грибов маркерным регионом является SSU-ITS1-5.8SrRNA-ITS2-LSU. Его длина составляет более 2000 пн, что не дает эффективно его исследовать с помощью Illumina MiSeq [Perspectives of using ... , 2020]. Illumina MiSeq считается в настоящее время наиболее удобным, дешевым и информативным методом при идентификации микроорганизмов из почвы. Для модификации метода мы предлагаем использовать смесь универсальных праймеров на несколько участков этого региона в одном секвенировании, чтобы получать данные для идентификации как на уровне рода, так и вида. В то же время будущее за методами позволяющими секвенировать сразу весь исследуемый регион в одном прочтении. Еще одной проблемой является недостаточность наполнения базы данных АМ грибов. AMF species list <http://www.amf-phylogeny.com/> насчитывает в настоящее время 355 видов АМ грибов (с описанием морфологии), эта цифра, вероятно, в разы меньше реального числа видов АМ грибов. По базам данных генетических последовательностей (например, NCBI) же известно менее 200 видов. Это приводит к выявлению виртуальных таксонов АМ грибов. Существует база виртуальных таксонов АМ грибов – MAARJAM [The online database ... , 2010], использование которой не эффективно, поскольку определение до рода не является достаточным, необходимо определение до вида. При этом около 20–30 % последовательностей АМ грибов в базе NCBI имеют ошибочную морфологическую идентификацию. Мы, используя отфильтрованные на ошибки данные NCBI создаем свою базу последовательностей. Для отсева ошибок анализируется как авторство, год секвенирования, так и ручной анализ выравнивания, филогенетический анализ. Все сомнительные последовательности отвергаются. Наша база содержит ин-

формацию по 33 родам и 176 видам АМ грибов в настоящее время. Это будет способствовать точной идентификации грибов АМ, в том числе коллекций грибов. В настоящее время коллекция АМ грибов ФГБНУ ВНИИСХМ насчитывает свыше 200 штаммов, часть из которых пока не определена до вида. Сбор штаммов произведен в различных областях европейской части России, значительная часть собрана на Кавказе [The biodiversity of ... , 2024]. Также часть штаммов собрана в поездке в горный Алтай в 2021 г. Работа по расширению коллекции АМ грибов и ее идентификация продолжается.

Исследования выполнены с использованием оборудования центра коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-16-00064.

Литература

Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi / A. A. Kryukov, A. O. Gorbunova, E. M. Machs [et al.] // Vavilovskii Zhurnal Genet Selektcii. 2020. Vol. 24, N 2. P. 158–167.

The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) / M. Öpik, A. Vanatoa, E. Vanatoa [et al.] // New Phytol. 2010. Vol. 188, N 1. P. 223–241. DOI: 10.1111/j.1469–8137.2010.03334.x.

The biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in some ecosystems of the North Caucasus temperate hotspot / A. Yurkov, A. Kryukov, A. Gorbunova [et al.] // J. Fungi. 2024. Vol. 10, N 1. Art. 11. DOI: 10.3390/jof10010011

РОЛЬ ЭНДОФИТНОГО ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 3Н И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ В КОНТРОЛЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

М. В. Кузнецова¹, Т. Н. Кузнецова¹, Р. Г. Фархутдинов²

¹ООО «Научно-внедренческое предприятие «БашИнком», Уфа
feomela_lina@mail.ru, tatiana-spiridonova79@yandex.ru

²Уфимский университет науки и технологий, Уфа, frg2@mail.ru

Ежегодно заболевания растений приводят к значительным потерям урожая основных сельскохозяйственных культур по всему миру. Более половины из этих заболеваний обусловлены действием фитопатогенных грибов. Использование для борьбы с ними химических фунгицидов часто оказывается неэффективным с экономической точки зрения и вредным для окружающей среды, в том числе для здоровья человека. В связи с этим все больше внимания уделяется разработке и использованию экологически безопасных методов защиты растений.

На сегодняшний день существуют два основных подхода к экологически безопасному контролю фитопатогенов: биологические фунгициды и устойчивые генетически модифицированные сорта растений. Однако без-

опасность и эффективность последних до сих пор является предметом дискуссий в связи с недостаточной изученностью. В свою очередь, биопрепараты на основе микроорганизмов для защиты растений имеет долгую историю и значительный потенциал, а вопрос о безопасности решается индивидуально в рамках соответствующих испытаний.

Наиболее известными и часто включаемыми в состав биофунгицидов являются спорообразующие грамположительные факультативно аэробные палочковидные бактерии *Bacillus subtilis*, относящиеся к ризосферным, эндофитным и эпифитным бактериям. Таким образом, их широкая распространенность в различных биотопах и высокая степень адаптивности спор к неблагоприятным условиям окружающей среды позволяет применять их в различных агроэкосистемах.

Именно широкий набор биологически активных метаболитов данных бактерий обеспечивает эффективный и пролонгированный контроль численности патогенов, поскольку они относятся к разным классам, имеют различное строение и механизмы действия, что снижает вероятность развития устойчивости у патогенов и обеспечивает долговременную защиту растений [Смирнова, Асатурова, Хомяк, 2018].

Таким образом, перспективной экологически безопасной альтернативой синтетических фунгицидов является создание биопрепаратов на основе активных метаболитов и живых клеток бактерий *B. subtilis* непатогенных для человека. Последнее свойство особенно важно в отношении эндофитных бактерий в связи с их способностью попадать в организм человека через нерафинированные растительные пищевые продукты. Перспективным в данном направлении является непатогенный для человека штамм *Bacillus subtilis* 3Н с известным клинически доказанным пробиотическим действием [Пат. № 2067616С1, 1996].

Цель – изучение фунгицидной активности штамма *B. subtilis* 3Н и его метаболитов.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили различные концентрации суспензии клеток и бесклеточного ультрафильтрата метаболитов штамма *B. subtilis* 3Н. В качестве эталона использовали бактериальную суспензию штамма *B. subtilis* 26Д в различных концентрациях. Для исследования антагонистических свойств использовались тест-культуры фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum*, *Helminthosporium sativum*, *Fusarium spp.* из собственной коллекции.

Фунгицидную активность в отношении тест-культур проводили *in vitro* на картофельно-глюкозном агаре (КГА) диффузным методом отсроченного антагонизма (метод «лунок»). Для этого 0,1 мл исследуемого образца помещали в лунку в центре чашки Петри со средой, содержащей тест-культуру. Через 3–5 сут. инкубации при комнатной температуре измеряли величину зоны угнетения роста тест-штаммов. Для каждого образца проводили испытание в трёх повторах с подсчётом средней величины зоны угнетения для вывода результатов. Контролем роста тест-культур служило их параллельное выращивание без исследуемых образцов.

Результаты. Согласно полученным результатам (табл.) оба штамма *B. subtilis* проявили антагонистическую активность в отношении тест-культур во всех разведениях. Причём штамм *B. subtilis* 3Н проявил большую фунгицидную активность по отношению к *F. culmorum* и *Fusarium spp.* по сравнению с эталоном во всех разведениях. В отношении *H. sativum* наибольшую фунгицидную активность проявил штамм *B. subtilis* 3Н в наименьшей концентрации (разведение 1:1000). Бесклеточный ультрафильтрат метаболитов *B. subtilis* 3Н проявил антагонистическую активность ниже по сравнению с исходной бактериальной суспензией штамма в отношении всех тест-культур. Наименьшие разведения (1:10) бактериальной суспензии эталонного штамма *B. subtilis* 26Д и бесклеточного ультрафильтрата метаболитов *B. subtilis* 3Н проявили равноценную антагонистическую активность в отношении *F. culmorum* и *Fusarium spp.*, но достоверно отличались при дальнейшем снижении концентрации. Образец бесклеточного ультрафильтрата метаболитов *B. subtilis* 3Н также проявил фунгицидную активность в отношении тест-культуры *H. sativum*, однако она была наименьшей среди всех образцов.

Таблица

Результаты оценки антагонистической активности *in vitro* диффузным методом лунок образцов штаммов *B. subtilis* к тест-культурам фитопатогенов

Тест-культура	Зона угнетения роста, мм (M±m)								
	<i>B. subtilis</i> 3Н			Бесклеточный ультрафильтрат <i>B. subtilis</i> 3Н			<i>B. subtilis</i> 26Д		
	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000	1:10	1:100	1:1000
<i>Fusarium culmorum</i>	40,5± 10,5	43,0± 6,0	34,5± 5,5	24,0± 4,0	13,5± 1,5	16,5± 2,5	24,0± 1,0	23,0± 1,0	24,0± 3,0
<i>Helminthosporium sativum</i>	53,0± 2,0	43,5± 7,5	58,0± 1,0	27,5± 0,5	28,0± 2,0	30,5± 2,5	49,0± 4,0	46,0± 1,0	38,0± 2,0
<i>Fusarium spp.</i>	51,5± 1,5	47,5± 1,5	57,0± 2,0	21,0± 1,0	21,0± 2,0	26,0± 1,0	23,0± 1,0	24,0± 1,0	20,0± 1,0

Таким образом, показано, что бактериальная суспензия пробиотического штамма *B. subtilis* 3Н по своим фунгицидным качествам не уступает эталонному фунгицидному штамму *B. subtilis* 26Д. Кроме того, бесклеточная суспензия метаболитов штамма сохраняет фунгицидные свойства, что также делает возможным её применение в качестве биофунгицида.

Литература

Пат. № 2067616С1 Рос. Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, С12R 1/125. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, несущий свойство антибиотикорезистентности, используемый для получения препарата «Бактиспорин»: № 95105920/13 : заявл. 25.04.1995 : опубл. 10.10.1996 / Н. А. Михайлова, Т. Н. Кузнецова, О. В. Кунягина ; заявитель Науч.-произв. объединение «Иммунопрепарат». 5 с.

Сидорова Т. М., Асатурова А. М., Хомяк А. И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов // Сельскохозяйственная биология. 2018. № 1. С. 29–37.

УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ К МИНЕРАЛЬНЫМ УДОБРЕНИЯМ И ПЕСТИЦИДАМ КАК ФАКТОР ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИНТЕГРИРОВАННЫХ СИСТЕМАХ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

В. Н. Купцов, Д. Д. Левченко, А. Р. Харитончик,
Т. Л. Степанова, Э. И. Коломиец

ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Республика Беларусь
kuptsov@hotmail.com

Устойчивость микробных агентов биологического контроля к действию минеральных удобрений и химических пестицидов является важной составляющей их успешного применения в интегрированных системах защиты растений. Согласно литературным данным оценка разнообразия микроорганизмов под влиянием различных пестицидов свидетельствует, что в результате длительного их контакта имеет место изменение микробного состава и увеличение бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* [Influence of Pesticides ... , 2023].

Целью работы являлось определение устойчивости микроорганизмов-антагонистов к применяемым концентрациям минеральных удобрений и химических пестицидов.

Объектами исследования являлись штаммы бактерий-антагонистов *B. licheniformis* 25 и *B. marisflavi* 20, выделенные из образцов грунта, отобранного у подножия солеотвала ОАО «Беларуськалий», а также штаммы *B. velezensis* БИМ В-439Д и *Ps. brassicacearum* БИМ-В-446Д, входящие в состав коммерческих биопестицидов «Бетапротектин» и «Экогрин», соответственно.

Влияние действия пестицидов на рост исследуемых штаммов оценивали методом «лунок» по диаметру зоны задержки роста бактерий. Отмечено, что наибольшей устойчивостью к действию пестицидов в рекомендуемых концентрациях обладает штамм *Ps. brassicacearum* БИМ-В-446Д, у которого наблюдались небольшие зоны задержки роста (14 -17 мм) под влиянием фунгицидов Скавей Хпро, Солигор и десиканта Тонгара. Штаммы *B. licheniformis* 25 и *B. velezensis* БИМ В-439Д оказались восприимчивыми к фунгицидам Скавей Хпро, Солигор, Нандо 500, Капелла, гербицидам Боксер, Бетарен Супер, Майстер Пауэр, Фалькон, десиканту Тонгара. Рост штамма *B. marisflavi* 20 ингибировался всеми исследуемыми пестицидами. Полученные данные свидетельствуют, что бактерии *Ps. brassicacearum* БИМ-В-446Д значительно превосходят изученные штаммы бацилл в устойчивости к действию химических пестицидов (табл. 1).

Таблица 1

Устойчивость бактериальных штаммов к химическим пестицидам

Название пестицида	Класс пестицида	Диаметр зоны задержки роста исследуемых штаммов, мм			
		<i>B. licheniformis</i> 25	<i>B. marisflavi</i> 20	<i>Ps. brassicacearum</i> БИМ-В-446Д	<i>B. velezensis</i> БИМ В-439Д
Галс	гербицид	0	15,0±0,3	0	0
Эмбарго	гербицид	0	13,0±0,1	0	0
Лорнет	гербицид	0	13,0±0,2	0	0
Зантран	гербицид	0	12,0±0,1	0	0
Скавей Хпро	фунгицид	15,0±0,2	13,0±0,2	17,0 ± 0,3	15,0±0,4
Тонгара	десикант	21,0±0,4	14,0±0,3	15,0 ± 0,3	32,0±0,8
Азорро	фунгицид	0	0	0	0
Аденго	фунгицид	0	14,0±0,3	0	0
Солигор	фунгицид	16,0±0,2	25,0±0,6	14,0 ± 0,4	18,0±0,3
Боксер	гербицид	18,0±0,3	24,0±0,7	0	16,0±0,4
Триада	фунгицид	0	14,0±0,2	0	0
Нандо 500	фунгицид	0	23,0±0,5	0	18,0±0,2
Репер трио	гербицид	18,0±0,5	16,0±0,4	0	0
Галион	гербицид	0	0	0	0
Спрут Экстра	гербицид	0	15,0±0,2	0	0
Митрон	гербицид	0	11,0±0,1	0	0
Корнеги	гербицид	0	13,0±0,2	0	0
Капелла	фунгицид	17,0±0,2	15,0±0,3	0	18,0±0,3
Бетарен Супер	гербицид	22,0±0,4	16,0±0,4	0	18,0±0,4
Майстер Пауэр	гербицид	18,0±0,3	26,0±0,6	0	17,0±0,4
Фалькон	гербицид	21,0±0,3	22,0±0,5	0	22,0±0,5
Хилер	гербицид	0	11,0±0,1	0	0
Пиксель, МД	гербицид	0	12,0±0,1	0	0
Примадонна	гербицид	0	13,0±0,2	0	0
Мерлин Флекс	гербицид	0	11,0±0,2	0	0
Дротик	гербицид	0	20,0±0,5	0	0
Октава	гербицид	0	18,0±0,3	0	0

Действие минеральных удобрений на исследуемые штаммы изучали путем посева на агаризованный питательный бульон с добавлением азотных (мочевина, сульфат аммония и аммиачная селитра) и калийных (сульфат калия и хлорид калия) удобрений в различных концентрациях. Согласно полученным результатам, все изученные штаммы способны сохранять рост при концентрации минеральных удобрений (за исключением мочевины) в диапазоне 1,8–2,6 г/л. К мочеvine в концентрации 2,6 г/л оказались устойчивы только штаммы рода *Bacillus*. Бактерий *B. licheniformis* 25 и *B. velezensis* БИМ В-439Д сохраняют способность к росту при повышении содержания мочевины в среде до 26,0 г/л. Установлено, что штаммы *B. marisflavi* 20 и *Ps. brassicacearum* БИМ-В-446Д сохраняли рост на среде с содержанием сульфата калия 26,0 г/л. Как следует из полученных данных, изученные бациллы оказались более устойчивыми

к повышенным (26,0 и 130,0 г/л) концентрациям хлорида калия и к моче-вине по сравнению с *Ps. brassicacearum* БИМ-В-446Д. Таким образом, изученные бактериальные культуры обладают выраженной устойчивостью в отношении большинства изученных минеральных удобрений в концентрациях, применяемых в сельском хозяйстве (табл. 2).

Таблица 2

Резистентность бактерий-антагонистов к минеральным удобрениям

Штамм	Рост бактерий на среде с добавлением минеральных удобрений											
	Нитрат аммония		Сульфат калия		Сульфат аммония		Хлорид калия			Мочевина		
	Концентрация, г/л											
	1,8	18,0	2,6	26,0	2,0	20,0	2,6	26,0	130,0	2,6	26,0	130,0
<i>B. licheniformis</i> 25	+++	+++	+++	–	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	–
<i>B. marisflavi</i> 20	+++	–	+++	++	++	–	+++	+++	+	+++	–	–
<i>Ps. brassicacearum</i> БИМ-В-446Д	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	–	–	–	–
<i>B. velezensis</i> БИМ В-439	+++	+++	+++	–	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	–

Примечание: «+» – слабый рост; «++» – умеренный рост; «+++» – хороший рост; «–» – рост отсутствует

Полученные результаты открывают перспективы совместного применения микробных биопрепаратов с минеральными удобрениями и пестицидами, что позволит снизить затраты по их внесению и повысить экономические показатели производства целевой продукции.

Литература

Influence of Pesticides and Mineral Fertilizers on the Bacterial Community of Arable Soils under Pea and Chickpea Crops / L. Khmelevtsova [et al] // J. Agronomy. 2023. N 13. Art. 750.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИМИКРОБНЫХ ЛИПОПЕПТИДОВ *BACILLUS SUBTILIS* GM5

Г. Ф. Лутфуллина, А. М. Абубакирова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, g.h95@mail.ru

Введение. Бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами огромного количества вторичных метаболитов, которые используются в медицине, фармацевтической промышленности, биотехнологии, ветеринарии и сельском хозяйстве. *Bacillus* продуцируют широкий спектр пептидов, которые синтезируются нерибосомными пептид синтетазами (НРПС), работа ко-

торых не зависит от иРНК. НРПС – модульные ферменты, которые из множества стандартных и непротеиногенных аминокислотных субстратов катализируют синтез важных пептидных продуктов [Structural advances ... , 2023]. Для биосинтеза НРПС бактериям *B. subtilis* необходима фосфопантетирилтрансфераза *Sfp*. Известно, что она активирует белок-переносчик пептидила (или тиолирующий домен), который представляет собой небольшой белок. Показано, что *B. subtilis* имеет четыре *sfp*-зависимых вторичных метаболита, три из которых кодируются кластерами генов НРПС (сурфактин, плипастатин и бациллибактин) и один гибридным кластером генов НРПС-ПКС (бациллен) [Corpuz, Sanlley, Burkart, 2022]. Как правило, в соответствии с пептидной структурой большинство НРПС *Bacillus* сгруппированы в три семейства: сурфактины, итурины и фенгицины. По действию НРПС *Bacillus* разделяют на антибиотики, цитостатики, иммуносупрессоры, токсины и др. НРПС *Bacillus* обладают поверхностно-активными свойствами, что обусловлено их амфифильной структурой, поэтому их называют биосурфактантами. Биосурфактанты обладают высокой селективностью, низкой токсичностью и высокой способностью к биологическому разложению, что делает их совместимыми с окружающей средой. Более того, они считаются противомикробными, противовирусными, противогрибковыми метаболитами [Structural advances ... , 2023].

Материалы и методы. Ранее нами было проведено полногеномное секвенирование штамма *Bacillus subtilis* GM5. Сборка генома *B. subtilis* GM5 депонирована в базу данных NCBI под номером NZ_NKJH00000000. Кроме того, с помощью программы antiSMASH в геноме штамма GM5 было идентифицировано шесть генных кластеров, участвующих в биосинтезе НРПС [Data on the genome ... , 2019]. На основе анализа геномных локусов *B. subtilis* GM5, ответственных за синтез антимикробных липопептидов, сконструировали праймеры к консервативным регионам целевых генов. Праймеры разработали с использованием программного обеспечения Oligo (National Bioscience Inc., версия 5). Синтез праймеров проводили в компании Евроген (Россия). Выделение РНК из клеток бактерии *B. subtilis* GM5 проводили с использованием реагента Trizol согласно протоколу ExtractRNA (Евроген, Россия) на 48 ч культивирования на среде Soybean Medium Nutrition (SMN) и среде LB. Анализ экспрессии генов антимикробных липопептидов *B. subtilis* GM5 *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Перед использованием все образцы выделенной РНК доводили до концентрации 30 нг/мкл. Для удаления остаточного экзогенного ДНК, полученный раствор РНК обрабатывали ДНКазой. Для измерения уровня экспрессии генов мРНК использовали метод количественной ОТ-ПЦР с использованием коммерческого набора OneTub RT-PCR SYBR («Евроген», Россия) и системы ПЦР в реальном времени. Все реакции проводили с использованием протокола:

95 °С в течение 15 мин, затем 40 циклов при 95 °С в течение 1 мин, 60 °С в течение 20 с и 72 °С в течение 30 с на амплификаторе CFX96™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler Bio-Rad. Температура отжига для всех праймеров генов-мишеней составляла 60 °С. Относительную экспрессию генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* рассчитывали с помощью алгоритма $^{\Delta\Delta C_t}$, а количество гена-мишени – по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Все образцы анализировали в трех повторностях.

Результаты. Оценили уровни экспрессии м-РНК генов сурфактин синтетазы (*srfAA*, *srfAD*), плипастанин синтетазы (*ppsB*) и синтетазы бацилликсина (*DhBF*) штамма *B. subtilis* GM5 с помощью метода ОТ-ПЦР. Для исследования экспрессии генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* штамм *B. subtilis* GM5 культивировали в среде SMN при pH 7,5 и температуре 37 °С в течение 72 ч. В качестве контроля использовали среду LB. Ранее нами было показано, что штамм GM5 не продуцирует или продуцирует липопептиды на низком уровне в среде LB [Абубакирова, Лутфулина, 2023]. Используя ген 16S рНК в качестве референсного, было установлено, что исследуемые гены экспрессируются в разной степени при культивировании штамма GM5 на среде SMN в течение 72 ч. Показали, что на 24 ч и 72 ч роста штамма GM5 экспрессия генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* ингибируется. На 48 ч роста штамма GM5 на среде SMN установлена относительная экспрессия генов *srfAA* (11,56±1,46 раз), *srfAD* (10,77±1,52 раз), *ppsB* (10,58±2,18 раз), *DhBF* (6,29±1,89 раз) (рис. 1).

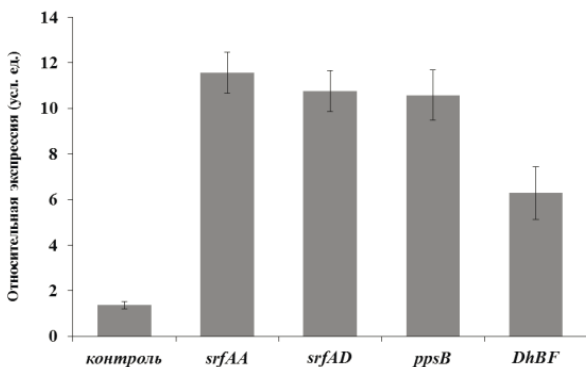


Рис. 1. Количественная оценка уровня м-РНК генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* штамма *B. subtilis* GM5 при культивировании на среде SMN при температуре 37 °С на 48 ч. Данные нормализованы в соответствии со значениями уровней экспрессии гена 16S рНК

Известно, что на разнообразие и объем синтеза разных липопептидов влияют условия культивирования штамма-продуцента и наличие в среде химических индукторов и разных источников углерода и азота для пита-

ния. Таким образом, показали, что на среде SMN на 48 ч роста повышается экспрессия генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB*, *DhBF* штамма GM5. Можно предположить, что индукция генов *srfAA*, *srfAD*, *ppsB* и *DhBF* коррелирует с антибактериальной и фунгистатической активностью суммарной фракции липопептидов *B. subtilis* GM5, полученной из среды SMN [Абубакирова, Лутфуллина, 2023].

Литература

Абубакирова А. М., Лутфуллина Г. Ф. Антимикробные свойства липопептидов бактерий рода *Bacillus* // Симбиоз-Россия 2022 : сб. ст. XIII Междунар. конф. ученых-биологов. Пермь, 2023. С. 4–10. DOI: 10.17072/simbioz-2022-5-11

Corpuz J. C., Sanley J. O., Burkart M. D. Protein-protein interface analysis of the non-ribosomal peptide synthetase peptidyl carrier protein and enzymatic domains // Synthetic and systems biotechnology. 2022. Vol. 7, N 2. P. 677–688.

Data on the genome analysis of the probiotic strain *Bacillus subtilis* GM5 / G. F. Hadieva, M. L. Lutfullin, D. S. Pudova [et al.] // Data in Brief. 2019. Vol. 23. Art. 103643. DOI: 10.1016/j.dib.2018.12.081

Structural advances toward understanding the catalytic activity and conformational dynamics of modular nonribosomal peptide synthetases / K. D. Patel, M. R. MacDonald, S. F. Ahmed [et al.] // Natural product reports. 2023. P. 1–33.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО УДОБРЕНИЯ НА ОСНОВЕ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ, СОДЕРЖАЩЕГО СТРЕПТОМИЦЕТЫ, НА ВЫРАЩИВАНИЕ ЦВЕТОЧНОЙ РАССАДЫ

Е. И. Маградзе, В. А. Кузнецова

Удмуртский государственный университет, Ижевск,
elena.magradze@gmail.com, bot.sad@mail.ru

Цветочная рассада пользуется популярностью у садоводов-любителей, ее используют в озеленении городских парков, скверов, клумб и бордюров. Рассада необходима не только для раннего цветения растений. Выращенная в тепличных, благоприятных условиях, рассада позволяет уменьшить расход семян, отобрать более крепкие растения. Рассада должна быть здоровой, растения должны быть крепкими. Для этого необходимо не только покупать качественные семена, но и создавать оптимальные условия для их выращивания. Одной из основных проблем при выращивании рассады являются инфекционные болезни, вызываемые различными грибами. Необходимо использовать удобрения, которые не только обладают фунгицидным эффектом, но и способствуют росту и развитию рассады. Немаловажным фактором является экологичность удобрения. Бактериальные препараты отвечают таким требованиям [Development of low ... , 2019].

Нами разработано бактериальное удобрение на основе молочной сыворотки, содержащее бактерии *Streptomyces coelicolor*. Благодаря своим

фунгицидным свойствам, а также способности синтезировать ростовые факторы для растений, стрептомицеты могут использоваться для создания биоудобрений [Новые штаммы ... , 2021, Actinobacteria as a source ... , 2023]. Удобрение содержит не менее 108 КОЕ стрептомицетов в 1 л культуральной жидкости. Культивирование осуществляется без перемешивания, поэтому стрептомицеты растут на поверхности культуральной жидкости, и в почву попадают не отдельными мицелиальными нитями, а колониями с развитым воздушным мицелием, на котором расположены споры. Это увеличивает выживаемость *Streptomyces coelicolor* в почве.

В опытах по влиянию нашего удобрения на выращивание цветочной рассады использовали семена петунии грандифлора, пеларгонии, бархатцев. Полив удобрением в каждом опыте осуществляли однократно. Семена петунии и пеларгонии поливали на следующие сутки после посева, бархатцы поливали в день посева. Полив удобрением почвы осуществляли из расчета 100 мл на 100 кв. см почвы. Большая часть стрептомицетов из удобрения, находящаяся в виде агрегатов, не фильтруется через почву, а находится у ее поверхности. Поэтому расход удобрения рассчитывали не на объем, а на площадь грунта так, чтобы на квадратный сантиметр приходилось не менее 10^5 КОЕ стрептомицетов. Так как семена цветочной рассады засевают в почву неглубоко, то они находятся в зоне расположения стрептомицетов.

В опыте с петуниями грандифлора использовали семена четырех сортов: Сассекс 360 Ред, Сассекс Эйч ди Лайт Пинк, Лимбо Джи Пи Бургунди, Лимбо Джи Пи Вайт. Семена засевали в ящики с грунтом по 245 шт. В опытах с удобрениями всошло от 81,6 до 96,3 % семян, тогда как в контроле всошло от 64,9 до 76,3 % петуний грандифлора. После пикирования рассады процент выживших растений в опыте, в целом, сохранился, однако в контроле снизился до 58,7–65,7 %. Большая часть погибших растений в контроле была заражена «черной ножкой».

Семена бархатцев сорта Антигуа Оранж были посеяны по 180 шт. в ящики с грунтом. Три ящика были политы удобрением, один ящик поливали водой. При пикировании сеянцев в горшочки через 16 дней количество выживших растений в ящиках с удобрением не отличалось от контроля. Через полтора месяца после пикирования выжило 46,67 % контрольных растений, и 78,33 % растений после полива удобрениями. Основной причиной гибели растений были грибковые заболевания.

Семена пеларгоний сортов Роуз и Пюр Вайт были посеяны в ящики по 33 штуки каждого сорта для полива удобрением и полива водой. Через месяц в ящиках с удобрением все растения выжили. В контрольных ящиках выжило 63,6 % растений сорта Роуз, и 78,8 % растений сорта Пюр Вайт. В контроле растения погибли от «черной ножки». Через два месяца после пикирования рассады число выживших пеларгоний Роуз уменьшилось до 54,5 %, тогда как в опыте погибло только одно растение. Количество пеларгоний Пюр Вайт в опыте и контроле осталось неизменным.

Таким образом, стрептомицеты положительно повлияли на прорастание семян и выживание цветочной рассады. Удобрение можно использовать для выращивания семян цветов в тепличных грунтах.

Литература

Новые штаммы стрептомицетов как перспективные биофунгициды / И. Г. Широких, Я. И. Назарова, А. В. Бакулина, Р. И. Абубакирова // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 1. С. 72–80.

Actinobacteria as a source of biocontrol agents for bio-organic culture / M. Kaary, R. Manikkam, K. K. Annamalai, J. Joseph // J. of Appl. Microbiol. 2023. Vol. 134., N 2. Art. 1xac047.

Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies / C. B. Lobo, M. S. J. Tomás, E. Viruel [et al.] // Microbiological Research. 2019. Vol. 219. P. 12–25.

ВОЗМОЖНАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ В ПРИКОРНЕВОЙ СРЕДЕ РАСТЕНИЙ ГОРОХА ПОСЛЕ ИХ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ ИЗ КОРНЕЙ В РИЗОСФЕРУ

**Л. Е. Макарова¹, Ю. А. Маркова¹, Ю. В. Зайцева²,
Ю. М. Константинов¹, И. В. Горбенко¹, М. С. Карпова¹,
П. А. Бизиков¹, И. А. Васильев¹**

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, makarova@sifibr.irk.ru

²Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль

В жизнедеятельности растительного организма важная роль принадлежит непатогенным эндофитным бактериям, которые исторически поселяются в растениях и вступают с ними в мутуалистические взаимоотношения [Эндофитные бактерии ... , 2015].

Ранее нами показано, что эндофитные бактерии могут перемещаться из корней проростков растений гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг в ризосферу [Interaction of Rhizospheric ... , 2021]. При выращивании проростков на водной среде из последней были выделены 6 штаммов бактерий. Обнаружено, что количество эндофитных бактерий, оказывающихся на поверхности корня проростков гороха, существенно превышает их количество в тканях корня.

С помощью анализа нуклеотидной последовательности фрагментов генов 16S рРНК установлено таксономическое положение этих штаммов в основном с точностью до рода (рис.).

У изолированных из прикорневой среды исследуемых штаммов PS1-PS6 проанализированы морфолого-культуральные показатели, активности гидролитических ферментов (пектиназы, целлюлазы, протеазы), ИУК-продуцирующая способность. Мы предполагаем, что в перемещении исследуемых бактерий во внешнюю среду задействованы синтезируемые в

их клетках гидролитические ферменты пектиназы и целлюлазы, вызывающие разрушение углеводных структур растительных клеточных стенок. К полезным для растения свойствам у изучаемых бактерий следует отнести наличие у них возможности для деградации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) [Interaction of Rhizospheric ... , 2021] и ИУК-продуцирующей способности.

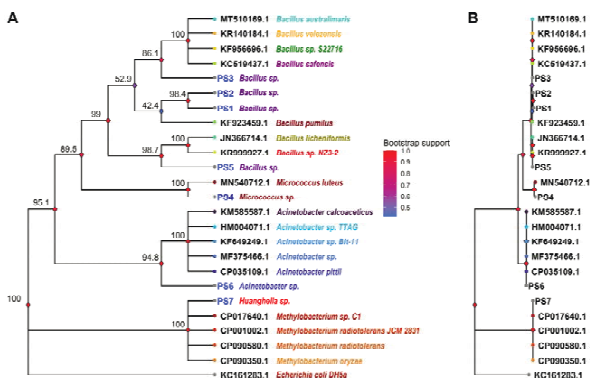


Рис. Филогения методом максимального правдоподобия в виде кладограммы (А) и дендрограммы (В) штаммов PS1-PS6 эндофитных бактерий, выделенных из водной среды, куда погружались корни проростков гороха сорта Торсдаг, и бактерий штамма PS7, выделенных из корней и корневых клубеньков растений гороха сорта Марат, и близких последовательностей, обнаруженных через BLAST

Среди выделенных из прикорневой среды проростков гороха наиболее активными в плане продуцирования ИУК оказались 2 представителя бактерий *Bacillus*: штаммы PS3 и PS5. В плане деградации ПАУ наибольшей активностью отличался штамм PS3 из рода *Bacillus* и бактерии *Acinetobacter*.

Штамм PS7, грамтрицательные палочки, был выделен только из корней и корневых клубеньков двух из четырех исследуемых сортов гороха. При этом данный штамм отличался более поздним появлением на агаризованных средах, чем штаммы PS1-PS6. Показатель КОЕ для PS7 оказался заметно выше у растений, произраставших на растворе нафталина в течение 1 сут. в фазе проростков.

Полагаем, что после выхода исследуемых эндофитных бактерий из корней в ризосферу установленные у них разные показатели продуцирования ИУК могут иметь, соответственно, различное значение для роста растения-хозяина. Вышедшие из корней растения во внешнюю среду эндофитные бактерии могут также неоднозначно повлиять на его взаимодействия с бактериями почвенной микробиоты посредством фталатов, образующихся с различной активностью в клетках исследованных эндофит-

ных бактерий при деградации ПАУ. Среди изученных штаммов можно выделить ряд штаммов, которые могут быть использованы для получения биоактивных препаратов соответствующего целевого практического назначения.

Литература

Эндوفитные бактерии в микробных препаратах, улучшающие развитие растений (обзор) / В. К. Чеботарь, Н. В. Мальфанова, А. В. Щербаков [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 5, № 3. С. 283–289.

Interaction of Rhizospheric Bacteria and Nonrhizobial Endophytic Bacteria Moving from the Roots to the Rhizosphere of Pea Plants (*Pisum sativum*) / L. E. Makarova, Yu. A. Markova, A. S. Morits [et al.] // Appl. Biochem. and Microbiol. 2021. Vol. 57, N 4. P. 514–520.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТА ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ И ИЗМЕНЕНИЯ ВКЛАДА АНАЭРОБНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ИНТРОДУКЦИИ ГИДРОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОМПСТИРУЕМЫЕ ПИЩЕВЫЕ ОТХОДЫ

В. В. Миронов

НЦМУ «Агротехнологии будущего» ФИЦ биотехнологии РАН
Москва, 7390530@gmail.com

Биомасса местных микроорганизмов в пищевых отходах (ПО), предназначенных для ускоренного компостирования, на ранних стадиях низкая, и требуется некоторое время для их размножения. Добавление полезных микроорганизмов должно усилить специфическую для компоста микробную активность, скорректировать структуру микробного сообщества и потенциально ускорить биодеградацию ПО. Целью данного исследования было выявление штаммов бактерий и грибов с характеристиками роста, подходящими для ускорения компостирования ПО. Из компостируемых отходов были выделены 75 чистых культур микроорганизмов, среди которых были обнаружены 66 культур бактерий и 9 культур грибов. 26 культур показали способность к гидролизу одного или нескольких биополимеров (крахмал, целлюлоза, белки) или липидов. Были отобраны для составления композиций 10 культур микроорганизмов родов *Bacillus* и *Penicillium* с максимальными гидролитическими активностями. Тестирование полученных композиций проводили при моделировании промышленного компостирования нестерильных ПО модельного состава в лабораторных условиях [Pollutant Emissions from ... , 2021]. В течение 7 недель с инокуляцией в начале или на 28-й день тремя различными композициями автохтонных культур оценивали реакцию на инокуляцию по увеличению образования CO₂, NH₃ и повышению температуры за счет самопроизвольного тепловыделения (рис.)

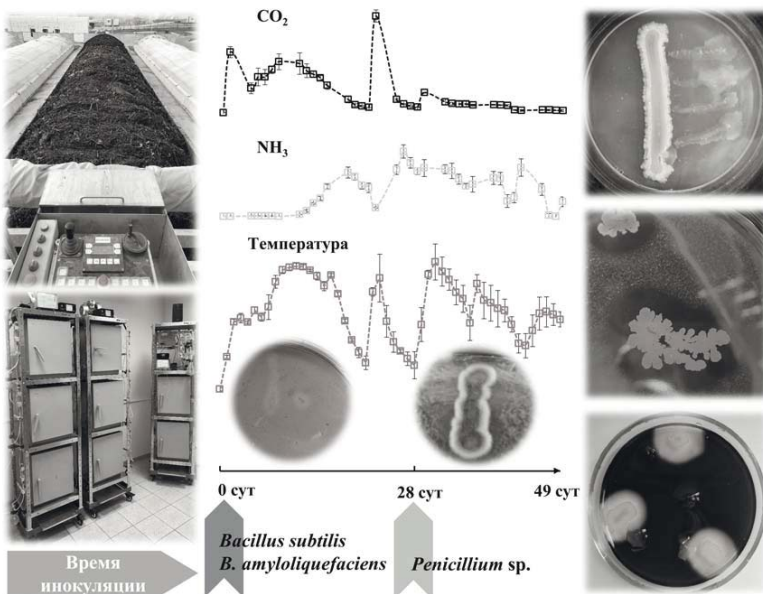


Рис. Скрининг гидролитически активных микроорганизмов для ускорения компостирования пищевых отходов

Концентрация инокулята 10^8 КОЕ/г ПО при соотношении вносимых микроорганизмов инокулята и автохтонных микроорганизмов ПО 1:10 увеличивала интенсивность биodeградации, тогда как концентрация 10^5 КОЕ/г ПО при соотношении вносимых и автохтонных микроорганизмов 1:2500, наоборот, значительно снижала. Использование композиции двух культур рода *Bacillus* в начале компостирования привело к наибольшему увеличению образования CO_2 в 2,8 раза, что соответствовало 1778 мг CO_2 /сут кг органических веществ отходов при сохранении образования аммиака 251 мкг NH_3 /сут кг и средней температуры 52°C на уровне контроля без инокулята. Усиление биodeградации происходило в результате увеличения доли анаэробного метаболизма за счет факультативно-анаэробных бактерий *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, что сопровождалось увеличением образования алифатических кислот, спиртов, кетонов и терпенов. Тогда как инокуляция композиции грибов *Penicillium* на 28 день компостирования дала наилучший эффект, увеличивая образование CO_2 в 1,8 раза, что соответствовало 402 мг CO_2 /сут кг, аммиака в 3,1 раза до 337 мкг NH_3 /сут кг и значимо повышая температуру до 43°C . Результаты расширяют представление о влиянии параметров инокуляции и состава гидролитически активных композиций на биodeградацию ПО при компостировании и могут быть использованы для целенаправленного конструирования микробных композиций.

Данная статья выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-318 от 20 апреля 2022 г. Грант предоставлен на государственную поддержку создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

Pollutant Emissions from Municipal Biowaste Composting: Comparative Analysis and Contribution of N-Containing Organic Compounds / V. Mironov, V. Zhukov, I. Moldon [et al.] // Energies. 2023. Vol. 16, N 21. Art. 7271. DOI: 10.3390/en16217271

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *K. PNEUMONIAE* В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* – *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* И В ПРИСУТСТВИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *S. AUREUS*

А. В. Миронова, М. С. Федорова, А. Р. Каюмов, Е. Ю. Тризна

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
amironova2019@mail.ru

Биопленки являются сложным структурно-организованным трехмерным сообществом бактерий, заключенным внутри полимерного матрикса, синтезированного членами этого сообщества. Высокая устойчивость бактерий в биопленке к антибактериальным препаратам связана, в первую очередь, с протективными свойствами матрикса, биохимический состав которого зависит от вида бактерий, образующих биопленку. В естественных условиях бактерии в основном существуют в составе смешанных сообществ, внутри которых наблюдаются разнообразные взаимодействия между микроорганизмами, от синергизма до антагонизма. Поэтому разработка новых стратегий борьбы с биопленками на основе механизмов межвидовой конкуренции, а также последующее создание препаратов, воздействующих на медиаторы микробных взаимодействий, могут стать альтернативой традиционным подходам терапии бактериальных инфекций, связанных с формированием биопленок.

В работе было показано, что в составе смешанных сообществ *S. aureus* – *K. pneumoniae* повышается чувствительность *K. pneumoniae* к антибиотикам широкого спектра действия. При этом количество внеклеточного матрикса в смешанных сообществах *S. aureus* – *K. pneumoniae* достоверно не отличалось, однако изменялся биохимический состав, по сравнению с мономикробными сообществами тех же видов. В смешанном сообществе происходит увеличение количества α - и β -полисахаридов в составе матрикса биопленки, что приводит к перестройке её структуры.

Посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией проводилась оценка экспрессии генов, ассоциированных с образованием биопленки. Было отмечено, что уровень экспрессии гена *icaA* понижается в полимикробных биопленках *S. aureus* – *K. pneumoniae* по сравнению с монокультурой *S. aureus*, в то время, как экспрессия гена *pgaA* повышалась в смешанном сообществе.

Вследствие изменения уровня экспрессии генов и, соответственно, состава внеклеточного матрикса может происходить изменение проницаемости биопленки для антимикробных препаратов. Так проницаемость смешанной биопленки *S. aureus* – *K. pneumoniae* была выше для ципрофлоксацина, чем моно-биопленки этих же видов.

Мы предположили, что данный эффект также может быть обусловлен синтезом клетками золотистого стафилококка внеклеточных метаболитов, оказывающих влияние на метаболизм *K. pneumoniae*, и, соответственно, на состав и структуру внеклеточного матрикса, а значит и проницаемость смешанного сообщества. Чтобы проверить это предположение, получили различные фракции бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) *S. aureus* и протестировали на культуре *K. pneumoniae*. Внесение фракций БКЖ *S. aureus* к моновидовой биопленке *K. pneumoniae* увеличивает содержание α - и β -полисахаридов и белков в матриксе до 2 раз. При этом в контрольных лунках α -полисахариды располагаются равномерно, в то время как в лунках, обработанных БКЖ *S. aureus*, этот компонент визуализируется в виде отдельных скоплений, плотных по своей структуре. Увеличение полисахаридного компонента также подтверждается значительным повышением уровня экспрессии генов *pgaA* *K. pneumoniae* в присутствии фракций БКЖ *S. aureus*.

Таким образом, внесение фракций БКЖ золотистого стафилококка способствует увеличению белков и полисахаридов в составе матрикса биопленки *K. pneumoniae* и приводит к изменению ее структуры, а также изменению экспрессии гена *pgaA*, ассоциированного с образованием биопленки. Подобные изменения могут влиять на проницаемость матрикса для противомикробных препаратов, и, как следствие, повышать чувствительность бактерий к антибиотикам, что необходимо учитывать при разработке подходов терапии инфекций, ассоциированных с образованием биопленок *K. pneumoniae*.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

БИОДЕГРАДАЦИЯ ПАУ РИЗОБИЯМИ В ПРИСУТСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

А. Ю. Муратова, С. Н. Голубев, И. Ю. Сунгурцева

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов, muratova_a@ibppm.ru

Тяжелые металлы (ТМ) и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) часто обнаруживаются одновременно в местах загрязнений, которые являются результатом либо естественных процессов (извержения вулканов, лесные пожары и т. д.), либо антропогенной деятельности (добыча и переработка угля или нефти, отходы металлургии и электроники). Совместное присутствие в почве ПАУ и ТМ оказывает негативное воздействие на окружающую среду сильнее, чем эти же загрязнители по отдельности [Quantitative evaluation ... , 2020] и поэтому крайне необходимы надежные способы их устранения. Методы биологической рекультивации загрязненных почв с использованием специализированных высокоактивных микроорганизмов остаются технологиями выбора для восстановления загрязненных участков, а их совершенствование в направлении поиска новых перспективных штаммов-ремедиантов актуальным.

Многие бактерии обладают огромным потенциалом для биоремедиации, однако большинство из них способны либо разлагать ПАУ, либо проявлять устойчивость к ТМ. Это связано с тем, что в присутствии ТМ, как правило, наблюдается ингибирование катаболизма ПАУ, вызванное токсическим действием металлов, направленным на структурное и функциональное нарушение белков – ферментов, участвующих в деградации органических соединений. Сообщения о бактериях, которые способны одновременно справляться с комплексным загрязнением ПАУ и ТМ немногочисленны, что свидетельствует о недостаточной изученности таких микроорганизмов и необходимости дальнейшего выявления и изучения бактериального потенциала для биоремедиации комплексных загрязнений [Characterization of the ... , 2020]. Физиолого-биохимические особенности бактерий семейства Rhizobiaceae, а также интенсификация в последнее время исследований, направленных на изучение их биоремедиационного потенциала, дают основание полагать, что представители ризобий могут стать успешными кандидатами для биоремедиации/фиторемедиации комплексного загрязнения почв ПАУ и ТМ [Genome-guided identification ... , 2019].

Целью работы являлось изучение деградации ПАУ в присутствии ионов тяжелых металлов ризобиями – представителями родов *Ensifer* и *Neorhizobium*. Исследования включали в себя геномный анализ представителей указанных родов и эксперименты *in vitro*. В качестве модельного ПАУ был выбран трехкольцевой фенантрен, деградацию которого анализировали в присутствии ионов двухвалентных металлов: Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ и Zn²⁺.

Анализ распределения признаков деградации ПАУ и устойчивости к тяжелым металлам в геномах бактерий семейства Rhizobiaceae, представленных в базе данных JGI IMG/M показал, что интересующее семейство обогащено штаммами, устойчивыми к тяжелым металлам (67 %), но обеднено штаммами, разлагающими ПАУ (4,7 %). Доля штаммов, сочетающих в себе генетические способности к деградации ПАУ и устойчивости к тяжелым металлам, составляла 3 %. Эксперименты *in vitro* позволили охарактеризовать деградацию ПАУ у ранее выделенных штаммов ризобий-деструкторов фенантрена *Ensifer meliloti* P221 и *Neorhizobium* sp. Rsf 11 из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>), а также оценить влияние ионов тяжелых металлов на этот процесс. Выделены и идентифицированы ключевые метаболиты фенантрена, образующиеся в результате его биodeградации ризобиями, а также определена активность вовлеченных в деградацию ПАУ ферментов – фенантренхинон редуктазы и протокатехоат диоксигеназы. Показано наличие различных стратегий металлоустойчивости у исследованных микроорганизмов. Выявлен диапазон концентраций ионов металлов, при которых сохраняется рост микроорганизмов и способность к деградации ПАУ.

На основании проведенного исследования можно заключить, что семейство Rhizobiaceae содержит хоть и небольшую долю устойчивых к тяжелым металлам ПАУ-деструкторов, но присутствие таких штаммов в заметном количестве означает, что их можно отбирать и в дальнейшем использовать в биоремедиации и фиторемедиации почв, комплексно загрязненных ПАУ и тяжелыми металлами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00578)

Литература

- Characterization of the phenanthrene-degrading *Sphingobium yanoikuyae* SJTF8 in heavy metal co-existing liquid medium and analysis of its metabolic pathway / C. Yin, W. Xiong, H. Qiu [et al.] // Microorganisms. 2020. Vol. 8, N 6. Art. 946.
- Genome-guided identification and characterization of bacteria for simultaneous degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and resistance to hexavalent chromium / Y. Huang, Y. Wang, H. Feng [et al.] // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2019. Vol. 138. P. 78–86.
- Quantitative evaluation of in-situ bioremediation of compound pollution of oil and heavy metal in sediments from the Bohai Sea, China / C. Wang, S. He, Y. Zou [et al.] // Marine Pollution Bulletin. 2020. Vol. 150. Art. 110787.

ЭНДОФИТНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

П. А. Назаров¹, М. В. Каракозова²

¹НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, nazarovpa@gmail.com

²Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных
и ароматических растений, Москва, mvk752002@gmail.com

Инфекционные болезни представляют собой серьезную проблему для глобальной системы здравоохранения, особенно из-за растущей проблемы антибиотикоустойчивости. Эта постоянно увеличивающаяся проблема требует регулярных исследований и разработки новых антимикробных агентов. Классические пути выделения антибиотиков из культивируемых микроорганизмов практически исчерпали себя. Для поиска нового антибиотика требуется проведение анализа нескольких миллионов колоний микроорганизмов, что увеличивает стоимость разработки препарата [Nazarov, 2022]. Особенно это становится очевидным в свете быстрого распространения резистентности у клинических штаммов, что снижает вероятность того, что инвестиции фармкомпаний в разработку новых антибиотиков окупятся в 20-летней перспективе действия патентной защиты.

В настоящее время разрабатываются новые подходы к поиску новых антибиотиков (рис.). К ним относятся: 1) поиск продуцентов антибиотиков среди некультивируемых микроорганизмов, 2) поиск антибиотиков среди микробиома экзотических животных, 3) высокопроизводительный скрининг библиотек синтетических химических соединений, 4) поиск антимикробных препаратов среди растительных экстрактов и, наконец, 5) поиск продуцентов новых антибиотиков среди микробиома растений, особенно среди эндофитов [Infectious Plant ... , 2020].

Вторичные метаболиты, производимые эндофитными микроорганизмами, становятся ценными источниками для выявления антимикробных веществ. Эти эндофитные микроорганизмы, обитающие во внутренних тканях растений, продемонстрировали способность генерировать разнообразные биоактивные соединения с заметным фармакологическим потенциалом. В результате из эндофитов было извлечено множество новых антимикробных веществ, особенно из эндофитных грибов и актиномицетов [Antimicrobial and Cytotoxic ... , 2023]. Тем не менее лишь небольшая часть из этих соединений прошла тщательное исследование их механизмов действия на бактериальные клетки. Кроме того, изучение их воздействия на антибиотикоустойчивые бактерии и идентификация биосинтетических генетических кластеров, ответственных за производство этих вторичных метаболитов, проводились только для ограниченного числа многообещающих соединений.



Рис. Основные пути получения новых антибиотиков

Таким образом, эндофитные микроорганизмы являются одними из наиболее перспективных источников получения антибиотиков в будущем и, без сомнения внесут свой вклад в преодоление кризиса антибиотикорезистентности, с которым столкнулась современное здравоохранение по всему миру [Antimicrobial Action ... , 2024].

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-15-00099.

Литература

- Antimicrobial Action Mechanisms of Natural Compounds Isolated from Endophytic Microorganisms / F. Eshboev, N. Mamadalieva, P. A. Nazarov [et al.] // Antibiotics (Basel). 2024. Vol. 13, N 3. Art. 271.
- Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Isolated from the Medicinal Plant *Hyssopus officinalis* / F. Eshboev, M. Karakozova, J. Abdurakhmanov [et al.] // Antibiotics (Basel). 2023. Vol. 12, N 7. Art. 1201.
- Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection / P. A. Nazarov, D. N. Baleev, M. I. Ivanova [et al.] // Acta Naturae. 2020. Vol. 12, N 3. P 46–59.
- Nazarov P. A. MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages // Antibiotics (Basel). 2022. Vol. 11, N 6. Art.734.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ДОМЕНА III (DIII) СТРУКТУРНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА Е ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА, СИНТЕЗИРУЕМОГО В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

**В. С. Несмеянова, Д. В. Шаньшин, Е. А. Волосникова,
Д. Н. Щербаков**

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, НСО, р. п. Кольцово,
nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

Вирус Западного Нила (ВЗН) – это арбовирус семейства *Flaviviridae*, рода *Orthoflavivirus*. Основными переносчиками ВЗН являются комары, преимущественно из рода *Culex*, а основными резервуарными хозяевами – птицы, участвующие в распространении вируса по всему миру. Люди и другие млекопитающие являются случайными хозяевами. ВЗН не передается от человека к человеку обычным путем, а также от животных к человеку без участия комаров [Hrušková, Sherbakov, Kazachinskaja, 2022]. При инфицировании ВЗН человек может заболеть широким спектром заболеваний, варьирующихся по степени тяжести, от бессимптомных форм, выявляемых серологическим методом или методом ПЦР, до лихорадочных состояний и неврологических расстройств, таких как энцефалит и менингит. Как и другие представители *Flaviviridae*, ВЗН использует свой гликопротеин Е для обеспечения прикрепления и проникновения в восприимчивую клетку-хозяина. Таким образом, гликопротеин Е представляет собой идеальную мишень для разработки как противовирусных, так и терапевтических препаратов [Development of peptides ... , 2021]. Белок Е состоит из трех отдельных доменов (от I до III), из них иммуноглобулиноподобный домен III (DIII) играет значительную роль в обеспечении прикрепления вируса к клеточным рецепторам [Development of peptides ... , 2021, Bhide et al., 2022, Engineering the Single ... , 2022]. В ряде исследований показано, что DIII является одним из главных регионов, вызывающих синтез нейтрализующих антител [Nesmeianova, Sherbakov, Kazachinskaja, 2021]. Более того, моноклональные антитела, выработанные против DI и DII, демонстрируют низкий потенциал нейтрализации ВЗН даже в очень высоких концентрациях [Engineering the Single ... , 2022]. В отсутствие специфического противовирусного или терапевтического лечения крайне важно разработать безопасную и эффективную профилактическую вакцину против ВЗН [Role of N-glycosylation ... , 2017].

Цель работы – получить рекомбинантный аналог домена III структурного гликопротеина Е вируса лихорадки Западного Нила с использованием бактериального продуцента.

В рамках исследования был разработан плазмидный вектор pET32-WNV-DIII, предназначенный для синтеза рекомбинантного белка DIII вируса Западного Нила (DIII-ВЗН) в бактериальных клетках. Клетки *E. coli*

BL21(DE3) были трансформированы плазмидным вектором pET32-WNV-DIII, что привело к получению стабильного штамма-продуцента BL21(DE3)-DIII-WNV, способного накапливать рекомбинантный DIII-B3N. Была проведена оптимизация условий культивирования этого штамма-продуцента, что позволило достичь среднего выхода продукта в 35 мг с 1 л культуры. Очистку белка проводили с использованием металлchelатной аффинной хроматографии на сорбенте Ni-IMAC септросы (GE Healthcare, США). Анализ функциональной активности очищенного рекомбинантного DIII-B3N проводили с помощью иммуоферментного анализа. Проверили взаимодействия рекомбинантного DIII-B3N с моноклональным химерным антителом 900ch нейтрализующим вирус Западного Нила. При достижении разведения 1/177142 препарата антитела 900ch в ИФА, полученный сигнал ОП значительно превышал фоновый и составил 1,6. Оценку аффинности полученного рекомбинантного DIII-B3N к мышинному антителу 9E2 проводили при помощи биослойной интерферометрии. Результаты показали, что константа диссоциации KD составила $1,46 \pm 0,27 \cdot 10^{-9}$ М, что свидетельствует о высокой аффинности данного взаимодействия.

Литература

Development of peptides targeting receptor binding site of the envelope glycoprotein to contain the West Nile virus infection / P. Mertinková, E. Mochnáčová, K. Bhide [et al.] // Scientific Reports. 2021. Vol. 11, N 1. P. 1–14.

Engineering the Single Domain Antibodies Targeting Receptor Binding Motifs Within the Domain III of West Nile Virus Envelope Glycoprotein / J. Hrušková, K. Bhide, P. Petroušková [et al.] // Frontiers in Microbiology. 2022. Vol. 13. P. 1–15.

Nesmeianova V. S., Sherbakov D. N., Kazachinskaja E. I. Using Flavivirus-Specific Monoclonal Antibodies to Study the Antigenic Structure of Flaviviruses and Develop Anti-Flavivirus Drugs // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2021. Vol. 36, N 2. P. 57–67.

Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity / M. Mossenta, S. Marchese, M. Poggianella [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017. Vol. 492, N 4. P. 579–586.

Signaling events evoked by domain III of envelop glycoprotein of tick-borne encephalitis virus and West Nile virus in human brain microvascular endothelial cells / K. Bhide, E. Mochnáčová, Z. Tkáčová [et al.] // Scientific Reports. 2022. Vol. 12, N 1. P. 1–15.

БИОСОВМЕСТИМЫЕ ГЕЛИ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ И УЛУЧШЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ ЖИВЫХ БАКТЕРИЙ

Ю. А. Николаев¹, Е. В. Дёмкина¹, О. А. Галуза¹, Н. Г. Лойко¹,
Т. А. Канапаций¹, И. А. Борзенков¹, И. В. Перминова²,
А. Н. Хрептугова², Г. И. Эль-Регистан¹

¹ФИЦ биотехнологии РАН, Москва, info@fbras.ru

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

Биопрепараты на основе живых микроорганизмов широко используются в биотехнологиях (пищевой, природоохранной, технической, сельскохозяйственной, биомедицине) в качестве биокатализаторов или заквасок. Основным недостатком многих биопрепаратов является высокая скорость гибели микроорганизмов и снижение титра жизнеспособных клеток ниже технологически приемлемого уровня. Известные эффективные приёмы длительного хранения биопрепаратов (лиофилизация, замораживание, хранение при околонулевых температурах) повышают стоимость применения препаратов. Поэтому изучение способов повышения выживаемости микроорганизмов при их длительном хранении высоко актуальны.

В настоящем исследовании разработан универсальный способ длительного хранения живых микроорганизмов путём их иммобилизации в гели различного состава, в результате чего многократно повышалась выживаемость микроорганизмов при их длительном хранении (снижалась скорость отмирания клеток), а также происходило улучшение технологических свойств биопрепаратов.

Объектами исследования были: углеводородокисляющие бактерии (УОБ) *Acinetobacter seifertii* WS1, *Pseudomonas extremaustralis* WS-1, *P. aeruginosa* OIS 4.8.1, *Rhodococcus qingshengii* 367-6, *Dietzia maris* 367-2, *A. junii* 2-1, а также молочнокислые бактерии (МКБ) *Enterococcus faecium* M3185 и *Lactobacillus paracasei* AK 508. Клетки стационарной фазы роста, выращенные на среде LB, были иммобилизованы в: силанольно-гуматные гели (СГГ) [Silanized humic substances ... , 2018, Immobilization of Cells ... , 2021], гели на основе желатина, камедей (ксантановой, гуаровой, геллановой). В динамике определяли титр жизнеспособных клеток, а также физиологические (=технологические) свойства микроорганизмов.

Культуры УОБ, иммобилизованные в СГГ сохраняли высокий титр жизнеспособных клеток в течение трёх лет (табл. 1), тогда как в контрольных культурах он был на несколько порядков ниже.

Стабилизированные препараты обладали более высокими технологическими характеристиками: скоростями окисления углеводов, стрессоустойчивостью и расширенным спектром окисляемых субстратов.

Культуры МКБ, иммобилизованные в гели, также имели пониженные скорости отмирания, что представлено в табл. 2 на примере иммобилизации *E. faecium* в СГГ.

Таблица 1

Титр жизнеспособных клеток углеводородокисляющих бактерий (КОЕ/мл) в силанольно-гуматном геле при хранении в течение 3 лет

	Исходно	2 года СГГ-(контроль)	3 года СГГ-(контроль)
<i>A. seifertii</i>	$5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8 - (1 \cdot 10^6)$	$2,2 \cdot 10^7 - (< 10^3)$
<i>P. aeruginosa</i>	$1 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^8 - (1 \cdot 10^6)$	$1,4 \cdot 10^8 - (< 10^3)$

Таблица 2

Титр жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий *E. faecium* (КОЕ/мл) в силанольно-гуматном геле при хранении в течение 2 мес.

Сут хранения	1	7	14	30	60
Контроль	$5,58 \cdot 10^8$	$3,72 \cdot 10^8$	$2,44 \cdot 10^8$	$3,94 \cdot 10^7$	$6,26 \cdot 10^6$
СГГ	$5,28 \cdot 10^8$	$5,88 \cdot 10^8$	$3,70 \cdot 10^8$	$3,78 \cdot 10^8$	$1,96 \cdot 10^8$

Культуры МКБ, иммобилизованные в гели, также имели пониженные скорости отмирания, что представлено в табл. 2 на примере иммобилизации *E. faecium* в СГГ.

Стабилизированные в гелях культуры МКБ сохраняли высокие титры жизнеспособных клеток, обладали высокими технологическими показателями (кислотообразования, газо- и ароматообразующей способностями), а по результатам органолептического анализа, стабилизированные варианты получили наивысший балл среди всех образцов, продукт с использованием СГГ признан наилучшим.

Причинами длительного выживания бактерий в СГГ являются: 1) нахождение большей части клеток в состоянии гипометаболизма и потребление ими органических кислот, (при этом уровень метаболизма понижается относительно растущих клеток в 10000 раз); 2) отсутствие массового автолиза клеток, что обусловлено разобщённостью клеток в геле и невозможностью создания достаточных концентраций ауторегуляторов и ферментов автолиза; 3) нахождение части клеток в состоянии покоя, в виде стрессоустойчивых цистоподобных клеток. 4) При переносе в гель формируется биоплёночный фенотип, обладающий повышенной стрессоустойчивостью.

Иммобилизация клеток бактерий в биосовместимые гели может рассматриваться как перспективный приём продления сроков хранения биопрепаратов различного назначения и одновременно – улучшения их технологических свойств.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 24-24-20062.

Литература

Immobilization of Cells of Hydrocarbon-oxidizing Bacteria for Petroleum Bioremediation Using New Materials / Yu. Nikolaev, I. Borzenkov, E. Demkina [et al.] // International Journal of Environmental Research. Vol. 15, N 6. P. 971–984.

Silanized humic substances act as hydrophobic modifiers of soil separates inducing formation of water-stable aggregates in soils / A. B. Volikov, S. A. Ponomarenko, A. I. Konstantinov [et al.] // Catena. 2016. Vol. 137. P. 229–236.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ПОЛИМЕРОВ ХИТОЗАНА АСКОМИЦЕТАМИ

Н. Н. Позднякова¹, Т. С. Бабичева², Д. С. Чернова², А. Б. Шиповская²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»

Саратов, pozdneyakova_n@ibppm.ru

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, shipovskayaab@yandex.ru

Хитозан представляет собой биогенный гетерополимер N-ацетилглюкозамина и глюкозамина. Среди наиболее обсуждаемых биологических свойств: антибактериальная, антигрибная и иммуностимулирующая активности. Хитозан, в качестве элиситора, повышает устойчивость растений к грибным и вирусным заболеваниям. Как и целлюлоза, этот биополимер обладает волокно- и пленкообразующими свойствами, что делает его перспективным материалом для биотехнологического применения, в том числе как биodeградируемых носителей фармацевтических препаратов, для очистки сточных вод промышленных предприятий от соединений металлов, в бумажной промышленности и т. д. Одним из направлений биотехнологии является получение композитных материалов на основе хитозана с новыми свойствами после обработки исходного полимера биологическими агентами (микроорганизмами и/или ферментами) [Хитин/хитозан и его ... , 2020].

Широкое использование полимерных материалов неизбежно приводит к возникновению двух проблем: к биоповреждениям в процессе их использования и биodeградации образующихся отходов, которые попадают в окружающую среду [Chitosan as an ... , 2020; Priyadarshi, Rhim, 2020]. Молекулярными технологиями показано, что основными грибными «игроками» в деградации и повреждении разного рода полимеров являются представители отдела Ascomycota. Большое количество экзоферментов, секретруемых аскомицетами, повышает биодоступность гидрофобных органических загрязнителей в окружающей среде и способствует их эффективной деградации [Asemoloye, Jonathan, Ahmad, 2019; Adedayo, Babalola, 2023].

В наших исследованиях использовали образцы хитозана со средней вязкостной молекулярной массой $M_n = 200, 460$ и 530 кДа, степенью деацетилирования 80 ± 2 мольн. % (ЗАО «Биопрогресс», г. Щелково). Аскомицеты *Trichoderma harzianum* и *Fusarium oxysporum* получены из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН.

При культивировании на среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии пленки хитозана, наблюдали активный рост обоих микромицетов (рис., а). В контрольных вариантах (без хитозана) рост микромицетов не наблюдался. Стоит отметить, что у *F. oxysporum* наблюдается более высокая адгезия к поверхности пленок хитозана по сравнению с *T. harzianum*.

Методом СЭМ зафиксированы множественные дефекты в морфоструктуре образцов, показывающие рост грибного мицелия не только на поверхности, но и в толще пленок. Поверхность исходных пленок хитозана, полученных из полимера с $\bar{M}_n = 200$ кДа, 460 кДа гладкая (рис., б), а образцов с $\bar{M}_n = 530$ кДа с небольшим продольным упорядочением. Морфоструктура пленок после роста *F. oxysporum* и *T. harzianum* имеет более развитую поверхность, чем исходные образцы. При этом наиболее заметные изменения наблюдаются для образца с $\bar{M}_n = 200$ кДа после роста *T. harzianum* – по всей поверхности видны множественные дефекты в виде глубоких «ямок». С увеличением молекулярной массы пленочных образцов дефектов становится меньше. Так, на пленках, полученных из полимера с $\bar{M}_n = 530$ кДа, после роста *F. oxysporum* заметны такие же дефекты, но менее выраженные – на них зафиксированы «ямки» диаметром 1,7–2,1 мкм (рис., в).

Увеличение поглощения среды культивирования при 600 нм также свидетельствует о росте грибов; в контрольных вариантах (без хитозана) роста не наблюдалось. Наиболее активно рост грибов наблюдался при использовании пленок с массой 200 кДа.

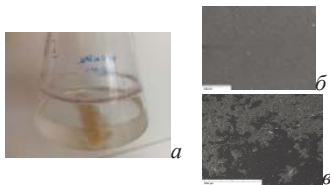


Рис. *F. oxysporum* в процессе культивирования на пленке хитозана с $\bar{M}_n = 460$ кДа (а) и СЭМ фотографии пленок до (б) и после роста *F. oxysporum* (в)

Визуальный осмотр пленок хитозана после культивирования грибов показал изменение цвета образцов со светло-бежевого до темно-коричневого и значимое повышение их прочности. После роста *F. oxysporum* и *T. harzianum* на пленках хитозана неожиданным оказалось значительное снижение растворимости полимера в ацетатном буфере, являющимся классической растворяющей средой, что может свидетельствовать о специфическом взаимодействии микромицета с полимером.

Изменения в ИК-спектрах пленок с $\bar{M}_n = 200$ и 530 кДа как после роста *F. oxysporum*, так и *T. harzianum* свидетельствуют о разрыве связи C-N и объясняют снижение растворимости. Уменьшение содержания азота во всех пленочных образцах подтверждается и элементным анализом, что доказывает включение этого биоэлемента хитозана в метаболизм грибов. На рентгеновских дифрактограммах пленок после роста микромицетов зафиксированы новые рефлексы. Отмечается также повышение степени кристалличности хитозана в пленках, наиболее значимо проявляющееся для полимера с $\bar{M}_n = 530$ кДа. Полученные результаты указывают на специфический механизм биодegradации аминополисахарида в культурах этих грибов.

Обнаружено также, что в процессе деградации пленок хитозана грибы *F. oxysporum* и *T. harzianum* продуцируют внеклеточные ферменты: гидролазу и пероксидазу. При этом на количественные показатели роста микромицетов и активность продуцируемых ферментов влияет молекулярная масса полимерного образца. Наиболее благоприятной средой для роста грибов и продукции ферментов явился хитозан с молекулярной массой 200 кДа.

Полученные данные вносят вклад в понимание процессов самоочищения природных экосистем от искусственных и синтетических полимеров и могут быть использованы для разработки экологических биотехнологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 22-23-00320, <https://rscf.ru/project/22-23-00320/>.

Литература

Хитин/хитозан и его производные: Фундаментальные и прикладные аспекты / В. П. Варламов, А. В. Ильина, Б. Ц. Шагдарова [и др.] // Успехи биологической химии. 2020. № 60. С. 317–368.

Adedayo A. A., Babalola O. O. Fungi that promote plant growth in the rhizosphere boost crop growth // J. Fungi. 2023. Vol. 9, N 2. Art. 239. DOI: 10.3390/jof9020239.

Asemoloye M. D., Jonathan S. G., Ahmad R. Degradation of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate (dichlorvos) through the rhizosphere interaction between *Panicum maximum* Jacq and some selected fungi // Chemosphere. 2019. Vol. 221. P. 403–411.

Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications / P. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, N. S. Kumar // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 150. P. 1072–1083.

Priyadarshi R., Rhim J.-W. Chitosan-based biodegradable functional films for food packing applications // Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2020. Vol. 62. Art. 102346.

РОСТОСТИМУЛИРУЮЩИЕ И ФУНГИСТАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РИЗОСФЕРНЫХ *BACILLUS*

**Т. М. Попова, А. Н. Николаева, Г. Ф. Лутфуллина,
А. М. Марданова**

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, azazel1212@rambler.ru

Повышение урожайности растений с использованием биоудобрений на основе Plant Grow-Promoting Rhizobacteria (PGPR) является перспективным направлением в сельском хозяйстве. PGP-бактерии влияют на рост растения различными механизмами, включая синтез широкого спектра вторичных метаболитов и фитогормонов [Kumar, Mahale, Krishna ... , 2021]. Помимо этого в основе непрямого механизма влияния ризобактерий на рост растений лежит их способность подавлять рост патогенов почвы через повышение устойчивости растений к болезням и продукцию специфических метаболитов, например липопептидов и др. Также глубокое понимание механизмов влияния микробиоты ризосферы на защиту

растения от фитопатогенных микромицетов даст возможность значительно увеличить его продуктивность, не нанося вред окружающей среде и здоровью человека. Таким образом, целью работы была характеристика ростостимулирующих и антагонистических свойств ризосферных штаммов *Bacillus*.

Исследуемые штаммы бактерий *Bacillus* sp. 1, 4, 20, 21, II были выделены из ризосферы картофеля. Ростостимулирующие свойства изолятов оценивали по способности продуцировать индолилуксусную кислоту (ИУК). Концентрацию ИУК в культуральной жидкости штаммов *Bacillus* определяли с использованием реактива Сальковского по методу, описанному в работе [Gordon, Weber, 1951]. Для исследования продукции ИУК использовали среду М9 с добавлением триптофана в концентрации 500 мкг/мл и без триптофана. Концентрацию ИУК оценивали при длине волны 540 нм.

Фунгистатическую активность изолятов исследовали методом блоков по отношению к фитопатогенным тест-культурам *F. oxysporum* DR57, *F. oxysporum* DR40, *F. solani* и *A. alternata* при температуре 30 °С в течение 4 сут. Антагонистическую активность оценивали по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \left(\frac{R-r}{R} \right) * 100\%,$$

где R – радиус колонии фитопатогена в контрольной чашке, r – минимальный радиус колонии фитопатогена в опытной чашке.

Общую геномную ДНК выделяли из ночной культуры с использованием коммерческого набора для выделения геномной ДНК GeneJET (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Концентрацию и качество ДНК оценивали с использованием NanoDrop 2000 (Thermo, США) и гель-электрофореза. ДНК хранили при -20 °С до дальнейшей обработки. ПЦР проводили с использованием универсальных праймеров к гену 16S рРНК 27F и 1492R. После получения данных о последовательностях ДНК обрезку последовательностей низкого качества проводили с помощью Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), для проведения запросов BLASTn для идентификации изолятов использовали доступные через Интернет базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Скрининг исследуемых штаммов на потенциальную способность к продукции липопептидов (сурфактина, бацилломицина, бактериомицина, итурина и фенгицина исследовали с помощью ПЦР и праймеров к генам соответствующих синтетаз. Наличие амплификатов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Анализ способности бактерий продуцировать ИУК по триптофанзависимому и триптофаннезависимому пути показал, что концентрация ИУК была значительно выше на среде с добавлением триптофана. У штаммов, растущих без триптофана, концентрация ИУК колебалась в пределах 1,7–3,8 мкг/мл, в то время как у растущих в присутствии 500 мкг/мл триптофана максимум значения доходил до 6,8 мкг/мл. Мак-

симум накопления ИУК (6,8 и 4,2 мкг/мл) в среде наблюдали на 72 ч у штаммов *Bacillus* sp. 1 и *Bacillus* sp. 20 соответственно. У штамма *Bacillus* sp. 4 максимум достигался на 60 ч (4,5 мкг/мл), у *Bacillus* sp. II – 66 ч (3,6 мкг/мл), а у *Bacillus* sp. 21 – 60 ч (3,7 мкг/мл). Таким образом, изоляты являются активными продуцентами индолилуксусной кислоты по триптофанзависимому пути.

Установили, что фунгистатическая активность против микромицетов наблюдалась у всех исследуемых штаммов бацилл, хотя и в разной степени. Наиболее чувствительной к фунгистатической активности исследуемых штаммов оказалась культура микромицетов *A. alternata*. Так, штамм *Bacillus* sp. II ингибировал рост колонии *A. alternata* на 80 %, а другие штаммы ингибировали на 61–72 %. Высокую активность в отношении штаммов *Fusarium oxysporum* проявляли штаммы *Bacillus* sp. 1 и *Bacillus* sp. 20 (50 % и 41 % соответственно), остальные штаммы ингибировали рост колоний грибов на 10–34 %. При этом штамм *Bacillus* sp. 1 ингибировал рост колонии *F. solani* на 31 %, тогда как остальные штаммы – на 18–25 %.

Результаты фунгистатической активности исследуемых 5 штаммов соотносятся с их способностью к продукции липопептидов. Каждый из исследуемых штаммов *Bacillus* обладал геном синтезат хотя бы одного из 5 липопептидов, а гены синтезат сурфактина (*srfA*) и бацилизина (*bcaA*) присутствует у всех штаммов кроме *Bacillus* sp. I (табл.).

Таблица

Наличие генов синтезат липопептидов в геномах ризосферных штаммов

Ген синтезаты липопептида	<i>Bacillus</i> sp. 1	<i>Bacillus</i> sp. 4	<i>Bacillus</i> sp. 20	<i>Bacillus</i> sp. 21	<i>Bacillus</i> sp. II
<i>ituC</i>		+		+	
<i>bmyB</i>	+	+			
<i>bcaA</i>		+	+	+	+
<i>srfA</i>	+	+	+	+	
<i>fenD</i>				+	+

Идентификация изолятов по 16S позволила предположительно отнести все выделенные штаммы к виду *Bacillus subtilis* (99,67–100 % гомологии). При этом необходимо отметить, что идентификации только по рибосомальным генам может быть недостаточно для однозначной дифференциации представителей рода *Bacillus*, и потому требуется дальнейшая идентификация изолятов с использованием других генов домашнего хозяйства.

Таким образом, исследуемые штаммы *Bacillus* обладают способностью к продукции ИУК и активной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микромицетам, что может быть использовано для дальнейшей разработки биопрепаратов для защиты и стимулирования растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-16-00138 на технической базе Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (Приоритет-2030).

Литература

- Gordon S. A., Weber R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // *Plant Physiol.* 1951. Vol. 26, N. 1. P. 192–195.
- Kumar S. S., Mahale A., Krishna J. R. A Critical Review on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Drought Stress Management Tool // *International Journal of Plant & Soil Science.* 2021. Vol. 33. P. 44–66.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ УТИЛИЗИРОВАТЬ ИМАЗАМОКС

Е. О. Приставка, Е. С. Шадрина, А. А. Левчук, Л. А. Беловеж

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

Иркутск, katya-i-95@mail.ru

Одним из важнейших аспектов охраны почв является проблема сокращения остаточных количеств пестицидов в окружающей среде. Степень отрицательного эффекта от применения пестицидов во многом определяется тем насколько быстро и эффективно происходит их естественная детоксикация в природе [Грачев, Варфоломеева, Денисова, 2019]. Основным подходом, применяемым для интенсификации процесса деградации пестицидов, является интродукция в почву культур микроорганизмов – активных деструкторов токсикантов. Перед интродукцией микроорганизмов в окружающую среду необходимо спрогнозировать их выживаемость, поведение и оценить эффективность биодеградации пестицида [Скрябина, Василенко, 2021]. Целью данной работы являлось изучение деструктивной активности бактерий по отношению к гербициду с действующим веществом имазамокс и определение культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков микроорганизмов. В качестве объектов исследования служили 7 штаммов бактерий, выделенных нами ранее из загрязненной пестицидом почвы. Образцы почвы были взяты с территории сельскохозяйственного сектора Иркутской области, где почва подвергалась сезонным обработкам гербицидом Пульсар, ВР (д. в. – имазамокс 40 г/л). Для оценки деструктивного потенциала бактериальных культур осуществляли их культивирование на питательной среде 8Е с высоким (1,44 г/л, выше ПДК в почве в 9 раз) содержанием пестицида. Бактерии инкубировали при 37 °С в течение 14 сут. Осуществляли ежедневный отбор проб для установления остаточных количеств пестицида в среде. Образцы центрифугировали для отделения биомассы и анализировались методом ВЭЖХ. Массовую долю имазамокса определяли с помощью хроматографической системы Agilent 1260 с УФ-детектором и обращенно-фазовой колонкой. В качестве элюента использовалась смесь ацетонитрил – 0,1 % ортофосфорная кислота в соотношении 22 : 78, по объему. Аналитическая длина волны 240 нм, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Контролем служила стерильная питательная среда с пестици-

дом. По окончании эксперимента максимальная убыль пестицида в питательной среде с высокой концентрацией имазамокса составила 15 % и 17 % для штаммов № 3 и № 6 соответственно. Остальные штаммы также утилизировали имазамокс, но в меньшей степени. На следующем этапе эксперимента, было проведено изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов бактерий. В результате микроскопирования было выявлено, что штаммы № 2, № 4, № 5 представлены палочками одиночными, собранными попарно и в цепочки. Штаммы № 3, № 6, № 7, № 8 представляли собой кокки, соединенные попарно, по четыре, а также собранные в виде гроздьев. Штаммы № 2, № 6 и № 7 являются подвижными. Все штаммы спор не образуют. При окрашивании по Граму и при проведении КОН-теста, было получено, что выделенные бактерии представлены как грамотрицательными (штаммы № 2, № 3, № 4, № 5), так и грамположительными (№ 6, № 7 и № 8) культурами. При определении культуральных признаков выделенных штаммов было показано, что при росте бактерий на среде МПА культуры образовывали колонии округлой формы, у большинства культур поверхность гладкая (у штамма № 6 шероховатая, у штамма № 8 радиально исчерченная). При изучении способности бактерий использовать углеводы, было отмечено, что три штамма (№ 6, № 7, № 8) использовали маннит. Глюкозу, сахарозу и лактозу использовал один штамм № 6, мальтозу – один штамм № 7. Четыре культуры не проявили сахаролитической активности (№ 2, № 3, № 4, № 5). При изучении способности выделенных штаммов использовать различные соединения азота, было обнаружено, что исследуемые культуры потребляли органические азотсодержащие вещества. Так при росте на среде МПБ с 0,01%-ным цистином и цистеином штаммы № 2 и № 3 образовывали сероводород, при росте на среде МПБ все штаммы выделяли аммиак, что говорит о способности выделенных микроорганизмов использовать аминокислоты. Штаммы № 6, № 7, № 8 способны разрушать триптофан с образованием индола. Рост на безазотистой среде Эшби наблюдался только у штаммов № 6, № 7 и № 8. Все штаммы обладали каталазной активностью в большей или меньшей степени. Определение внеклеточных ферментов выделенных штаммов показало, что к образованию коллагеназы способны следующие штаммы: № 2, № 6, № 7, № 8, что проявлялось в разжижении желатины. Казеинолитической активностью обладали штаммы № 2, № 4, № 8, вызывая пептонизацию молока. Ни один штамм не гидролизировал крахмал, что позволяет сделать вывод об отсутствии фермента амилазы. Ни один штамм (кроме штамма № 2) не обладал лецитиназной активностью, что говорит об отсутствии возможного патогенного потенциала выделенных почвенных бактерий. При оценке влияния факторов внешней среды на выделенные штаммы бактерий, было обнаружено, что по отношению к кислороду 6 штаммов являются факультативными анаэробами. Штамм № 2 является аэробом и растет только на поверхности среды. По отношению к темпера-

туре исследуемые штаммы хорошо росли при 20 °С, 26 °С и 30 °С. При 10 °С у штаммов № 5, № 6, № 7 и № 8 наблюдался слабый рост, а штаммы № 2, № 3 и № 4 не росли при данной температуре. В связи с этим выделенные бактерии можно отнести к мезофильным микроорганизмам. На основании полученных данных о морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойствах культуры бактерий были идентифицированы до рода. Так, штамм № 2 отнесен к роду *Acinetobacter* sp., штамм № 4 определен как *Agrobacterium* sp., штамм № 5 *Flavobacterium* sp., два штамма № 7 и № 8 отнесены к роду *Micrococcus* sp.

Таким образом, в ходе исследования были идентифицированы, выделенные из загрязненной пестицидом почвы, культуры микроорганизмов. Выявлены два штамма бактерий, способные утилизировать высокие концентрации пестицида в среде, которые могут быть перспективными для деструкции остаточного количества гербицида имазамокс в почве.

Литература

Грачев Н. Н., Варфоломеева М. М., Денисова М. Э. Проблемы детоксикации остаточных пестицидов и тяжелых металлов в почвах // Техническое обеспечение сельского хозяйства. 2019. № 1 (1). С. 167–174.

Скрябина Э. Д., Василенко Т. А. Микробная деструкция пестицидов в почве (обзор) // Безопасность, защита и охрана окружающей природной среды: фундаментальные и прикладные исследования : сб. докладов Всерос. науч. конф. Белгород, 11–15 окт. 2021 г. Белгород, 2021. С. 216–220.

РИЗОСФЕРНЫЕ БАКТЕРИИ, ЭФФЕКТИВНО УТИЛИЗИРУЮЩИЕ ФТАЛАТЫ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

А. А. Пьянкова¹, А. В. Краева², Е. Г. Плотникова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –

филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, annpjankva@mail.ru, peg_el@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, akraeva2002@gmail.com

Фталаты – соли и эфиры фталевой кислоты, являются широко распространенными труднорастворимыми поллютантами [Biodegradation of ... , 2018]. Значительное количество фталатов (до 634 мг/кг) выявлено в промышленном районе Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС) [Бачурин, Одинцова, 2009]. Предполагается, что бактерии, ассоциированные с растениями, оказывают положительный эффект на деструкцию фталатов (в частности, дибутилфталата, ДБФ) [Responses of soil ... , 2019]. Кроме того, остается малоизученной способность бактерий осуществлять деструкцию фталатов в условиях засоления [Biodegradation of ... , 2018].

Цель работы – выделить из ризосферы растений, произрастающих на территории промышленных разработок ВМКМС, активные бактерии-деструкторы фталатов, идентифицировать и определить их способность осуществлять разложение ДБФ в условиях засоления.

Из ризосферы растений бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), выделен штамм *Rhodococcus* sp. 5A-K4, способный к росту на дибутилфталате (ДБФ) в качестве единственного источника углерода и энергии при высоких концентрациях (до 12 г/л). Штамм рос на среде без соли, а также при наличии 30 г/л NaCl в среде культивирования. Интересен факт, что *Rhodococcus* sp. 5A-K4 не способен использовать в качестве субстрата *орто*-фталевую кислоту (ОФК), являющуюся основным промежуточным метаболитом разложения ДБФ, описанным для большинства аэробных бактерий-деструкторов фталатов [Degradation of ... , 2006].

Другой штамм 2A-K22, выделенный из ризосферы растений бескильницы расставленной, был идентифицирован как представитель рода *Halomonas* (сем. *Halomonadaceae*). По гену 16S рРНК данный штамм проявлял сходство на уровне 100 % с галофильным штаммом *Halomonas titanicae* ВН1^Т. Штамм 2A-K22 не способен к росту на ДБФ, но использовал *орто*-фталевую кислоту в качестве ростового субстрата, причем как на среде без соли, так и в присутствии до 200 г/л NaCl.

Проведены эксперименты по совместному культивированию двух штаммов (*Rhodococcus* sp. 5A-K4 и *Halomonas* sp. 2A-K22) на ДБФ (1 г/л) при разных концентрациях соли. Показан эффективный рост ассоциации бактерий без соли, а также при 30 и 50 г/л NaCl (рис.). Вероятно, начальные этапы деструкции ДБФ до ОФК осуществляет *Rhodococcus* sp. 5A-K4, а далее, накапливающуюся в культуральной среде ОФК использует в качестве субстрата *Halomonas* sp. 2A-K22. Подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) каждого штамма в составе ассоциации, возможный при наличии отличающихся морфологических характеристик (цвет, размер и т. д.) колоний, выросших на богатой агаризованной среде Раймонда [Корсакова, Пьянкова, Плотникова, 2023], показал значительное увеличение численности клеток *Halomonas* sp. 2A-K22 (более чем в 100 раз) по сравнению с численностью КОЕ *Rhodococcus* sp. 5A-K4, при росте на 30 и 50 г/л соли. Индивидуально штамм *Rhodococcus* sp. 5A-K4 не рос на ДБФ в присутствии 50 г/л NaCl, однако в составе ассоциации количество КОЕ штамма увеличивалось в 5 раз. Можно предположить положительное влияние галофильного штамма 2A-K22 на способность к выживанию и деструкции ДБФ штамма 5A-K4 в условиях повышенной засоленности среды.

Выделенные и охарактеризованные ризосферные штаммы-деструкторы представляют интерес для дальнейшего изучения с целью использования их при разработке методов био(фито)ремедиации засоленных почв, загрязненных фталатами.

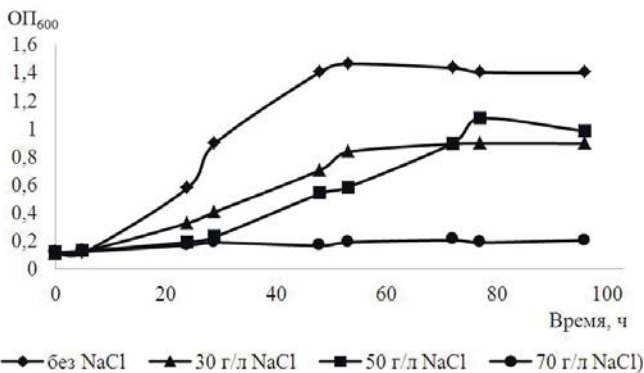


Рис. Рост ассоциации бактерий *Rhodococcus* sp. 5A-K4 и *Halomonas* sp. 2A-K22 на ДБФ в качестве субстрата, при разных концентрациях NaCl

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00308).

Литература

Бачурин Б. А., Одинцова Т. А. Отходы горно-обогатительного производства как источники эмиссии органических поллютантов // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). 2009. № 8. С. 374–380.

Корсакова Е. С., Пьянкова А. А., Плотникова Е. Г. Бактерии-деструкторы дибутилфталата, выделенные из ризосферы мятлика лугового (*Poa pratensis* L.) // Вестник Пермского унта. Серия: Биология. 2023. Вып. 4. С. 349–355.

Biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate by a halotolerant consortium LF / F. Li, Y. Liu, D. Wang [et al.] // PLoS One. 2018. Vol. 13. Art. e0204324.

Degradation of di-butyl-phthalate by soil bacteria / W. L. Chao, C. M. Lin, I. I. Shiung, Y. L. Kuo // Chemosphere. 2006. Vol. 63. P. 1377–1383.

Liang D.-W., Zhang T., Fang H., He J. Phthalates biodegradation in the environment / D.-W. Liang, T. Zhang, H. Fang, J. He // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 2008. Vol. 80. P. 183–198.

Responses of soil microbial community and enzymes during plant-assisted biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate and pyrene / K. Wu, C. Dumat, H. Li, H. Xia [et al.] // International Journal of Phytoremediation. 2019. Vol. 21. P. 683–692.

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИОННОГО ПРОФИЛЯ
ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ФУМАРАТА
ОБЛИГАТНОГО МЕТАНОТРОФА
*METHYLOTUVIMICROBIUM ALCALIPHILUM 20Z-3E***

**О. Н. Розова, С. Ю. Бут, К. С. Шавкунов, О. И. Мельников,
В. Н. Хмеленина, И. И. Мустахимов**

Пушкинский научный центр биологических исследований РАН, Пушкино,
rozovaolga1@rambler.ru

Метанотрофы, использующие метан как единственный источник углерода и энергии, активно изучаемая последнее десятилетие группа бактерий. Развитие постгеномных технологий значительно расширило представление о потенциале метанотрофов как продуцентов разнообразных ценных метаболитов. Метанотрофные культуры были протестированы на способность производить полноценный кормовой белок, биоразлагаемый полимер поли-β-гидроксibuтират, компоненты для нанотехнологий, липиды и каротиноиды, а также углеводное сырье для микробной ферментации. Одним из наиболее перспективных для биотехнологий штаммов признан галотолерантный метанотроф *Methylotuvimicrobium alcaliphilum 20Z*, обладающий высокой скоростью роста и устойчивостью в широком диапазоне условий (Khmelenina et al., 1999). С использованием методов генетического редактирования были получены штаммы *M. alcaliphilum*, продуцирующие 2,3-бутандиол (Nguyen et al., 2018), путресцин (Nguyen, Lee, 2019), альфа-гумулен (Nguyen et al., 2020), шинорин и ацетоин (Nguyen et al., 2021). Получению штаммов-продуцентов способствует системный подход, включающий наличие метаболической модели (ММ), подтвержденной показателями роста и скоростей поглощения метана и кислорода (Akberdin et al., 2018). Для достоверности ММ также необходимы данные транскриптомики и кинетики ферментов. Несколько десятилетий считалось, что у метанотрофов класса *Gammaproteobacteria*, к которому относится и *M. alcaliphilum 20Z*, цикл Кребса разомкнут на уровне α-кетоглутаратдегидрогеназной реакции и, следовательно, является только поставщиком интермедиатов для биосинтетических процессов. Однако с помощью C¹³ было показано, что ~50 % малата в клетке образуется в результате замкнутости цикла Кребса, тогда как вторая часть является следствием реакций C3-карбоксилирования (Nguyen, et al., 2020). На основе протеомных исследований было установлено, что цикл Кребса у *M. alcaliphilum 20Z* разветвлен на уровне превращений фумарата в малат и α-кетоглутарата в сукцинат (Akberdin et al., 2018). В предыдущих исследованиях нами доказано, что у *M. alcaliphilum 20Z*, в отличие от близкородственного вида *M. buryatense 5G(B1)*, фумаразы I и II классов функционально взаимозаменяемы (Melnikov et al., 2023). Более того, мутантный штамм *M. alcaliphilum 20Z-3E* с делетированными генами *ΔfumI*, *ΔfumII* и

Deltae, кодирующими фумаразы I и II классов и малик-фермент, соответственно, привело к накоплению внеклеточного фумарата в концентрации 2,6 мг/г веса сухой биомассы. Целью данной работы являлось проведение транскрипционного анализа штамма *M. alcaliphilum* 20Z-3E для выявления отличий в экспрессионном профиле генов, вызванных введением мутаций.

Дифференциальный анализ экспрессии показал, что у штамма *M. alcaliphilum* 20Z-3E по сравнению с диким типом 41 и 86 гена были активированы и подавлены, соответственно, с кратностью изменения ≥ 1 ($p \leq 0,05$). Наибольшее увеличение экспрессии (в 4 раза) имел ген, кодирующий транскрипционный регулятор MerR (MEALZ_4001), находящийся перед генами *rpoD* (MEALZ_4002), *hflK* (MEALZ_4003) и *hflC* (MEALZ_4004). Данные гены, кодирующие фактор $\sigma 70$ РНК-полимеразы и белки-шапероны HflK и HflC, соответственно, также увеличили свою активность более чем в 2 раза. Интересно, что у многих бактерий протеаза FtsH и ее модуляторы HflK и HflC образуют большой белковый комплекс, который способствует как контролю качества мембранных белков, так и регуляции клеточного ответа на стресс окружающей среды (Chu et al., 2016). Поскольку штамм 20Z-3E выбрасывает в окружающую среду фумаровую кислоту, вызывающую подкисление среды, возможно, увеличение уровня экспрессии белков HflK и HflC является ответом на изменение pH. Кроме того, более чем в 3 раза увеличена экспрессия *cfa* гена, кодирующего циклопропан-жирно-ацил-фосфолипидсинтазу, образующую циклопропан в фосфолипидах. На примере *E. coli* и *Helicobacter pylori* было показано, что наличие циклопропанового кольца уменьшает проницаемость фосфолипидных бислоев, что снижает чувствительность клетки к кислотному шоку (Cronan, Luk, 2022). Еще одним геном, увеличившим экспрессию более чем в 3 раза, является *glgP* ген, кодирующий гликогенфосфорилазу, участвующей в деградации гликогена с высвобождением глюкозо-1-фосфата. Штамм 20Z-3E действительно содержит в 2 раза меньше гликогена, по сравнению с диким типом. Вероятно, образующийся глюкозо-1-фосфат, поступая в ФФн-зависимый гликолиз, способствует обогащению клетки энергией. Среди генов, наиболее снизивших экспрессию (от 32 до 128 раза), представлены гены, отвечающие за транспорт гема/Fe в клетку и расположенные в одном локусе ДНК (MEALZ_3764–3774). Интересно, что фумараза I класса, удаленная в штамме 20Z-3E, является железосодержащим ферментом. Возможно, снижение экспрессии генов, ответственных за транспорт гема/Fe, связано с отсутствием одного из ферментов, требующего для своей активности железо. На примере *Pseudomonas aeruginosa* было показано, что увеличение экспрессии RpoH ($\sigma 32$ РНК-полимеразы) повлекло увеличение экспрессии глутаматсинтазы, большой и малой субъединицы нитритредуктазы и фумаразы (Williamson et al., 2023). Мы же наблюдали уменьшение экспрессии перечисленных генов на фоне выключенных фумараз. Интересно, могло ли выключение фумаразы спровоцировать изменения в экспрессии $\sigma 32$ фактора РНК-полимеразы, что, в свою очередь, привело к изменению экспрессии других генов?

Таким образом, проведенный нами анализ нить-специфичного 3'-концевого секвенирования мРНК показал, что основные изменения в экспрессионном уровне генов у штамма-продуцента фумарата 20Z-3E связаны с ответом на кислотный шок и с уменьшением экспрессии некоторых генов транспорта железа, что коррелирует с удалением фермента, у которого железо входит в активный центр. Поскольку мы не обнаружили изменений в транскрипции генов центрального метаболизма, накапливаемый внеклеточный фумарат, видимо, является следствием работы ферментов С3-карбоксилирования, восполняющих пул оксалоацетата, который через аспарат и аденилосукцинат направляется на синтез фумарата, причем как у мутантного, так и у дикого штаммов. Однако в диком штамме образующийся фумарат за счет фумаразы превращается в малат, который возвращается в основной метаболизм в реакции малик-фермента (Rozova et al., 2019). О разветвленности цикла Кребса говорится в более раннем исследовании Akberdin с соавт. (2018 г.), однако в качестве связующего звена между аспаратом и фумаратом авторы предложили аспарат-аммонийлиазу – фермент, отсутствующий у данного метанотрофа. Проведенные нами эксперименты указывают на функциональность у *M. alcaliphilum* 20Z аденилосукцинатного шунта и, вероятно, наличие узкого места в цикле Кребса на уровне активности МаДГ, вследствие высокой K_m для НАД⁺ (0,5мМ) (Rozova et al., 2015).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-24-00497.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ МЕТАЛЛОЭНДОПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS PUMILUS*

Н. Л. Рудакова, Д. И. Хасанов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань
natalialrudakova@mail.ru

Внеклеточная металлоэндопептидаза *Bacillus pumilus* 3019 охарактеризована как белок с уникальным классификационным положением, сочетающем принадлежность к двум крупным семействам клана метцинкинов – астацинам и адамализинам [A novel secreted ... , 2010]. При этом семейство адамализинов включает исключительно эукариотические белки, имеющие важное значение в реакциях дифференцировки тканей, эмбриогенезе, а также в метастазировании. Бациллярная металлопротеиназа во многом гомологична каталитическому домену мультидоменных эукариотических адамализинов. Описаны некоторые аспекты регуляции исследуемой металлопротеиназы, а также её биологические характеристики [Regulating Pathways ... , 2024]. Однако функция фермента в клетках бацилл остается не установленной.

Данные кристаллографии белка позволят получить более детальное представление об организации как активного центра фермента, так и всей третичной структуре. Исходный штамм *Bacillus pumilus* 3–19 продуцирует металлопротеиназу в крайне низких количествах (рис.).

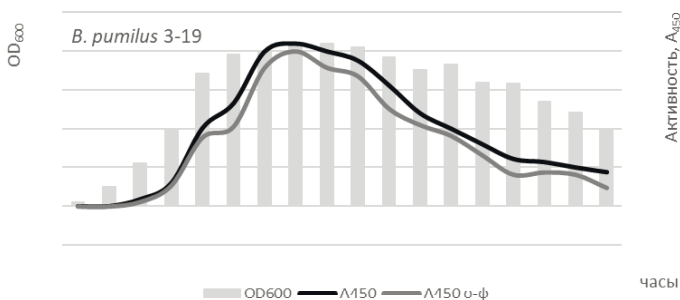


Рис. Динамика роста (OD600) и накопления протеолитической активности (A450) штаммом *Bacillus pumilus* 3–19. Уровень протеолитической активности в присутствии специфического ингибитора металлопротеиназы 1,10-фенантролина (A450 о-ф) незначительно ниже исходного (A450).

Для проведения структурного анализа необходимо получить гомогенный препарат фермента в высокой концентрации. Для наработки белка в препаративных количествах были сконструированы рекомбинантные штаммы-продуценты металлопротеиназы MprBp на основе беспротеазных штаммов *B. subtilis* и метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*.

Бациллярные штаммы были сконструированы путем трансформации вектором pGP382mprBp, несущим ген металлопротеиназы mprBp. Штаммы *B. subtilis* BG2036, *B. subtilis* BRB08 и *B. subtilis* BRB14 являются беспротеазными. Штамм *B. subtilis* Δ6 сконструирован на основе *B. subtilis* 168 путем CRISPR/Cas9 удаления профаговых регионов [Altenbuchner, 2016]. Для удобства последующей очистки методом аффинной хроматографии в вектор pGP382 к гену фермента была добавлена Strep-tag последовательность. Продукенты *P. pastoris* HC-mprBpP5 и *P. pastoris* LC-mprBpP9 созданы на базе коммерческой экспрессионной системы PichiaPink™ Expression System (Invitrogen) с высококопийным (HC) и низкокопийным (LC) вариантами вектора. Дрожжевые вектора содержали His-tag последовательность.

Эффективность продукции металлопротеиназы штаммами-продуцентами выражали как отношение разницы уровня протеолитической активности в присутствии специфического ингибитора металлоферментов 1,10-фенантролина и без него (A450-A450 о-ф) к оптической плотности культуры продуцента (OD600) (таб.).

Таблица

Сравнительная оценка эффективности продукции металлоэндопептидазы *B. pumilus* рекомбинантными штаммами-продуцентами

Штамм	Продуктивность, усл. ед.
Исходный штамм	
<i>B. pumilus</i> 3–19	0,048
Штаммы-продуценты	
<i>B. subtilis</i> BG2036+ <i>mprBp</i>	3,16
<i>B. subtilis</i> Δ6+ <i>mprBp</i>	2,46
<i>B. subtilis</i> BRB08+ <i>mprBp</i>	2,2
<i>B. subtilis</i> BRB14+ <i>mprBp</i>	1,25
<i>P. pastoris</i> HC- <i>mprBpP5</i>	2,5
<i>P. pastoris</i> LC- <i>mprBpP9</i>	1,28

Для бацилл оценивали значение при максимальном уровне протеолитической активности в культуральной жидкости штамма, для дрожжей – после индукции метанолом.

В результате было установлено, что наиболее эффективным продуцентом металлоэндопептидазы *Bacillus pumilus* 3–19 является бациллярный штамм *B. subtilis* BG2036+*mprBp*. Данный штамм будет использован для наработки фермента для возможности дальнейшего проведения структурных характеристик белка (ЯМР, рентгеноструктурный анализ).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 23-24-10059.

Литература

- A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius* / A. R. Sabirova, N. L. Rudakova, N. P. Balaban [et al.] // FEBS Letters. 2010. Vol. 584. P. 4419–4425.
- Altenbuchner J. Editing of the *Bacillus subtilis* genome by the CRISPR-Cas9 system // Applied and environmental microbiology. 2016. Vol. 82, N 17. P. 5421–5427.
- Regulating Pathways of *Bacillus pumilus* Adamalysin-like Metalloendopeptidase Expression / N. L. Rudakova, A. R. Sabirova, D. I. Khasanov [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25, N 1. P. 1–9.

ТЕХНОЛОГИЯ СКРИНИНГА ПРОДУЦЕНТОВ СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ, ОСНОВАННАЯ НА ДРОЖЖЕВОМ α -ФАКТОРЕ И ФЕРОМОНОВОМ СИГНАЛЬНОМ ПУТИ

Ф. А. Сабирзянов¹, А. В. Хованкина^{1,2}

¹АО «НИИ Аджиномото-Генетика», Москва, fanis_sabirzyanov@agri.ru

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Дрожжи, такие как *Saccharomyces cerevisiae* и *Komagataella phaffii* (более известные как *Pichia pastoris*), традиционно используются в качестве продуцентов гетерологичных секретируемых белков, функционирование которых требует характерных для эукариот пост-трансляционных модификаций. Наряду с методами рационального дизайна, в создании продуцентов белков все чаще с успехом применяют методы высокопроизводительного скрининга.

Мы разработали универсальную технологию высокопроизводительного скрининга дрожжевых продуцентов секретируемых белков на основе дрожжевого α -фактора и феромонового сигнального пути. Модификации продуцента, необходимые для функционирования системы скрининга включают: а) введение «феромонового повтора» (последовательности гена α -фактора, фланкированной последовательностями для созревания) в экспрессионную кассету, кодирующую целевой белок и б) удаление собственных генов предшественника α -фактора. Сконструированный сенсорный штамм представляет собой гаплоидный штамм *S. cerevisiae* MATa типа спаривания, содержащий следующие модификации: 1) делеции генов предшественников α -фактора (*MFA1* и *MFA2*) для уменьшения способности к скрещиванию между продуцентом и сенсором; 2) ген флуоресцентного белка, экспрессируемый под контролем феромон-индуцируемого промотора; 3) делеция гена *FAR1* – фактора ареста клеточного цикла и 4) делецию пептидазы *BARI*, специфичной к α -фактору для улучшения чувствительности сенсорного штамма.

Разработанная технология скрининга была успешно опробована на примере селекции после УФ-мутагенеза улучшенного продуцента модельного белка (β -галактозидазы из *Aspergillus niger*) с использованием 96-луночных микропланшетов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОЛЩИНЫ РАБОЧЕГО СЛОЯ ПЛОСКОСТНЫХ ФОТОБИОРЕАКТОРОВ ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Г. А. Савиных, Д. А. Габриелян, А. К. Габриелян, Д. А. Лось

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН
Москва, ifr@ippras.ru

Микроводоросли – это фотосинтезирующие микроорганизмы, которые играют важную роль в образовании кислорода и органических соединений на Земле. Они имеют широкое применение в различных сферах деятельности человека благодаря своим уникальным возможностям продуцировать ценные метаболиты, витамины и другие органические соединения [Assessment of the ... , 2019]. Для интенсивного выращивания микроводорослей существуют различные методы и устройства. Получение биомассы высокого качества требует специальных фотобиореакторов (ФБР), которые создают и поддерживают оптимальные условия для интенсивного роста культуры или накопления целевого продукта, а также сочетают в себе множество многоцелевых решений. Наиболее оптимальным вариантом конструкции ФБР является прямоугольная емкость, наподобие аквариума, в которой находится культивируемая культура. Емкость может быть как прозрачной с внешним освещением, так и непрозрачной с внутренним освещением. Оптимальный лабораторный вариант ФБР – плоскостной ФБР объемом от 5 до 25 л с внешним искусственным освещением [Optimization of CO₂ ... , 2022].

Важным параметром, который нужно учитывать при культивировании микроводорослей является оптическая плотность (ОП) суспензии. От нее зависит количество света, получаемого клетками, а, следовательно, и интенсивность фотосинтетической активности. С увеличением ОП во время культивирования количество света, проникающего внутрь суспензии, падает, растет темновой объем, что снижает общую продуктивность культуры и производительность ФБР. Для того чтобы увеличить продолжительность активного роста клеток культуры, реакторы имеют определенную толщину, создавая тонкий рабочий слой суспензии, через который свет может проникать во внутренние слои суспензии даже при относительно высоких значениях ОП.

В ходе данной работы было проведено исследование зависимости интенсивности освещения, проходящего через слои суспензии разной толщины, от различной оптической плотности культуры. Исследование проводилось на зеленой микроводоросли *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1. В экспериментальную установку, состоящую из светодиодной пластины с четырьмя полосами по три светодиода (SMD2835, 3000К) с диммером и датчика интенсивности освещения (LI-COR LI-189), закрепленных на ос-

нове из оргстекла, помещались кюветы разного размера, в которые помещалась суспензия различной оптической плотности (рис. 1).

Значения интенсивности света на светодиодной панели выставлялись следующие: ~260, ~460, ~760, и ~2400 мкмоль/м²с. Измерения проводились на внутренней светопринимающей поверхности кюветы, контактирующей со суспензией. Образцы с различной оптической плотностью были получены разбавлением обессленной фильтрованной водой исходной маточной культуры (ОП 8.6). Получены следующие значения ОП: 0 (вода без культуры), 0,3; 1,2; 5 и 8,6. Суспензия различной ОП заливалась в стеклянные кюветы одинаковой высоты и толщины стекла, с различной шириной (путем прохождения света): 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 мм. Результаты измерений представлены на рис. 2. Задано пороговое значение интенсивности света, которое могут получать клетки до начала потерь продуктивности при фотодоыхании – 10–15 Вт/м² или 45,5–68,1 мкмоль/м²с. [Цоглин, Пронина, 2012] В графиках принят верхний порог, все точки являются экспериментальными данными.

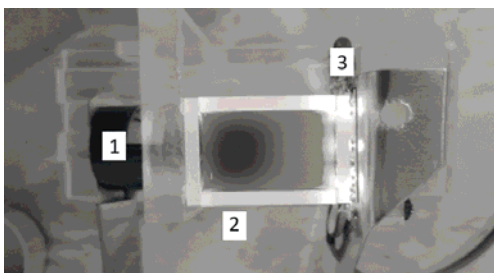


Рис. 1. Экспериментальная установка:

- 1 – датчик интенсивности света; 2 – кювета с исследуемой суспензией;
3 – светодиодная панель, подключенная через диммер к блоку питания

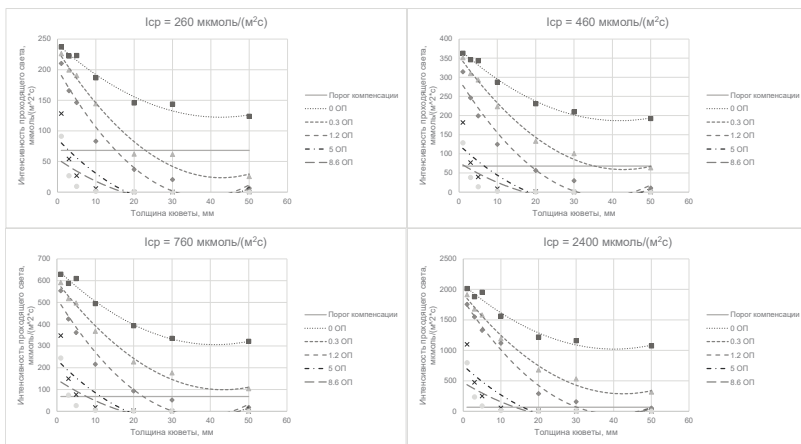


Рис. 2. Графики, полученные в результате исследования

В результате, удвоив толщину, при которой интенсивность падает ниже порогового значения, можно получить толщину рабочего слоя для заданной интенсивности освещения и оптической плотности. К примеру, при интенсивности освещения в 760 мкмоль/м²с можно достигать ОП в 1,2 единицы в рабочем слое толщиной 50 мм. Рабочий слой в исследовании неподвижный, в отличие от реальных условий в ФБР, где постоянно идет перемешивание суспензии путем барботаж, что позволяет слоям меняться местами, а клеткам поочередно получать достаточное количество света до определенного этапа.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, проект № 21-74-30003.

Литература

- Цоглин Л. Н., Пронина Н. А. Биотехнология микроводорослей. М. : Научный мир, 2012. 184 с.
- Assessment of the biotechnological potential of cyanobacterial and microalgal strains from IPPAS culture collection / M. A. Sinetova, R. A. Sidorov, A. Yu. Starikov [et al.]// Appl. Biochem. Microbiol. 2020. N 56. P. 794–808.
- Optimization of CO₂ Supply for the Intensive Cultivation of *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 in the Laboratory and Pilot-Scale Flat-Panel Photobioreactors / D. A. Gabrielyan, B. V. Gabel, M. A. Sinetova [et al.]// Life. 2022. N 1469. P. 1–14.

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУР РОДА *BACILLUS* НА РАЗВИТИЕ БОЛЕЗНЕЙ ЛИСТОВОГО АППАРАТА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Ю. Н. Санеева, Н. В. Безлер

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы
и сахара им. А. Л. Мазлумова

Нерациональное использование почв, неправильный выбор технологии обработки привели к деградации почвенного покрова, в частности, к переуплотнению пахотного горизонта и увеличению фитотоксичности, что изменяет соотношение групп микроорганизмов, в сторону увеличения патогенной микрофлоры. Болезнь приводит к увеличению содержания восстанавливающих сахаров, использование сахара в общем метаболизме сокращается. При церкоспорозе усиливается транспирация, что приводит к снижению веса корнеплода, а также распространение болезней снижает урожай на 16 % [Стогниенко, Селиванова, 2008].

Перспективным направлением в борьбе с заболеваниями является использование микробиологических препаратов на основе штаммов микроорганизмов-антагонистов почвенных патогенов. Среди них выделяются аборигенные штаммы *Bacillus subtilis*, которые обладают способностью адаптироваться к природным условиям места обитания. К тому же у многих видов рода *Bacillus* установлено продуцирование в почву физиологиче-

ски активных веществ. В связи с этим разработка методов борьбы с заболеваниями культуры с использованием аборигенных штаммов микроорганизмов – естественных антагонистов фитопатогенов на основе бацилл актуальна [Биопрепараты в сельском ... , 2005, Характеристика Алирина ... , 1995].

Определение заболеваний сахарной свеклы проводилось в полевых условиях на опытном поле ВНИИСС в зернопаропропашном севообороте с чередованием культур: пар – озимая пшеница – сахарная свекла – ячмень. Технология возделывания культуры – общепринятая для ЦЧР. В качестве объекта исследования взяты штаммы бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* 20 и 17(8). Суспензии штаммов наносились опрыскивателем с титром жизнеспособных бактериальных клеток 10^8 КОЕ/мл. Расход рабочей жидкости составит 200 л/га. В качестве контроля будет взят вариант без обработки бактериальной суспензией, в качестве стандарта – вариант с обработкой препаратом Алирин Б.

Учет основных болезней листового аппарата проведены в соответствии с «Основными методами фитопатологических исследований» под редакцией Чумакова Е. А. (1974 г.), а также «Рекомендациями по учету и выявлению вредителей и болезней...» (1984 г.).

Схема полевого опыта будет включать следующие варианты:

- 1) контроль;
- 2) стандарт – обработка биопрепаратом «Алирин-Б» превентивно, $0,26 \cdot 10^9$ *Bacillus subtilis* ВИЗР-10/м²
- 3) обработка штаммом *Bacillus subtilis* 17(8) превентивно, $2 \cdot 10^{10}$ кл/м²;
- 4) обработка штаммом *Bacillus subtilis* 20 превентивно, $2 \cdot 10^{10}$ кл/м²;

Повторность опыта – 4-кратная. Площадь делянки 54 м². Расположение делянок систематическое.

Определение заболеваний сахарной свеклы по листовому аппарату показало следующие результаты (табл.).

Таблица

Болезни листового аппарата сахарной свеклы

Вариант	Альтернариоз		Церкоспороз		Желтуха		Фомоз	Мучнистая роса	
	R (%)	P (%)	R (%)	P (%)	R (%)	P (%)	P (%)	R (%)	P (%)
Контроль	0,53	10,33	0,33	6,30	5,47	20,77	14,3	0,60	5,00
Алирин Б	0,53	10,00	0,13	3,10	3,57	13,23	8,95	0,53	4,00
<i>B. subtilis</i> 20	0,40	8,33	0,27	5,27	4,47	16,03	12,01	0,57	4,00
<i>B. subtilis</i> 17 (8)	0,37	8,33	0,30	4,43	2,67	10,17	12,33	0,37	2,67

R – интенсивность развития болезни, P – распространенность болезни/

По результатам работы можно сделать вывод, что препарат «Алирин-Б» имеет высокую степень защиты от наиболее распространенных заболеваний сахарной свеклы. Однако результаты исследований доказывают, что суспензии *Bacillus subtilis* 20 и 17(8) действуют аналогично препарату «Алирин-Б», а в случаях развития и распространенности альтернариоза и

мучнистой росы, интенсивности развития церкоспороза проявляют себя более эффективно, снижая показатели болезней.

Литература

Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) / И. А. Тихонович, А. П. Кожемяков, В. К. Чеботарь [и др.]. М. : Россельхозакадемия. 2005. 154 с.

Стогниенко О. И., Селиванова Г. А. Болезни сахарной свеклы, их возбудители : илл. справ. Воронеж : Антарес, 2008. 112 с.

Характеристика Алирина Б, основного компонента и фунгицидного препарата, продуцируемого штаммом *Bacillus subtilis* –10– ВИЗР / Ю. Д. Шейн, И. И. Новикова, Г. Л. Матвеев [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. 1995. Т. 40, № 5. С. 3–7.

СОЛНЕЧНЫЙ ФОТОБИОРЕАКТОР ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЦЕННОЙ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ В РЕГИОНАХ С ПОВЫШЕННОЙ ИНСОЛЯЦИЕЙ

А. А. Свиридов¹, Д. А. Габриелян^{1,2}

¹Московский авиационный институт

(национальный исследовательский университет), Москва, mai@mai.ru

²Институт физиологии растений РАН, Москва, ifr@ippras.ru

Микроводоросли (МВ) являются микроскопическими одноклеточными организмами. Как и высшие растения микроводоросли в процессе фотосинтеза за счёт энергии света поглощают окисленные неорганические вещества (воду и CO₂) и минеральные соли, преобразуют их в белки, жиры, углеводы и другие вещества, выделяя кислород.

Но микроводоросли имеют отличия, которые и вызывают большой интерес. Во-первых, их культивирование не требуют больших посевных площадей, благодаря чему возможно выращивать микроводоросли в условиях, где выращивание высших растений невозможно. Во-вторых, большинство микроводорослей отличается высокой скоростью роста и простотой условий культивирования. При этом микроводоросли содержат большое количество полезных веществ, а в некоторых МВ их доля превышает содержание в привычных растениях-источниках [Олескин, Цао Боян, 2022].

МВ находят практическое применение в фармакологии, косметологии, химической промышленности, производстве БАД и пищевых добавок. Биомасса микроводорослей используются в качестве корма для скота и рыб. Некоторые виды применяются для очистки сточных вод и производства биотоплива 3-го поколения [Мещерякова, Нагорнов, 2012].

Для массового производства микроводорослей в фотобиореакторах (ФБР) можно использовать два основных подхода: один – культивирование в открытых системах (при прямом взаимодействии культуры микроводорослей с окружающей средой), другой – в закрытых или полужакрытых резервуарах.

В закрытых ФБР контакт культуры с внешней средой ограничен. По сравнению с открытыми системами, основным преимуществом является большее значение соотношения светопринимавшей поверхности к объёму резервуара, что способствует эффективному использованию световой энергии и приводит к большим значениям продуктивности [Cultivation of *Chlorella* ... , 2022]. А также в закрытых ФБР лучше контролируются условия выращивания, риск загрязнения и потери суспензии меньше. С другой стороны, их обслуживание требует больших затрат, необходимо наличие системы терморегулирования и других систем поддержания условий культивирования. При интенсивном росте МВ закрытые ФБР необходимо постоянно дегазировать, выгоняя кислород, образующийся в результате фотосинтеза, избыток которого может ингибировать рост культуры.

Несмотря на более высокие урожаи биомассы, достижимые в закрытых или полузакрытых ФБР (по сравнению с открытыми системами), их высокие затраты на строительство и обслуживание по-прежнему делают их менее конкурентоспособными для массового производства микроводорослей. Однако использование таких систем не имеет альтернативы при задаче производства штаммов микроводорослей, содержащих ценные или биологически активные соединения, требующие защиты от загрязнения и наличия контролируемых условий культивирования.

Для таких целей авторами предложено решение располагать закрытые солнечные фотобиореакторы (СФБР) в регионах с повышенной инсоляцией на территориях не пригодных для сельского-хозяйства. Во-первых, наличие высокой интенсивности света, а также максимальной длительности светового дня позволяет значительно сэкономить на искусственном освещении и использовать его только ночью для компенсации фотодыхания и потери продуктивности культуры. Во-вторых, нет прямой необходимости в подогреве суспензии в дневное время, а охлаждение в случае перегрева можно реализовать из близлежащих водоемов, возвращая воду обратно в источник.

В качестве примера была рассмотрена модель вертикального трубчатого ФБР, который предполагается разместить в Краснодарском крае. ФБР состоит из 12 прозрачных трубок из оргстекла диаметром 0,05 м и высотой 2,52 м. Расстояние между трубками 6 см. Общий объём – 59л. В ночное время будет использоваться светодиодное освещение, интенсивность которого равна естественному ($178,9 \text{ Вт/м}^2$).

По данным сайта Global Solar Atlas для Краснодарского края оптимальный угол наклона светопринимавших поверхностей составляет 35° . Средняя температура летом 21°C . Продолжительность солнечного сияния составляет 2139 ч в год. Длительность светового дня – $T = 12 \text{ ч}$.

Для расчёта производительности в условиях искусственного освещения использована формула (1). В случае естественного освещения используют формулу (2) [Цоглин, Пронина, 2012]:

$$P_n = \frac{14,4 \cdot \eta \cdot I \cdot S \cdot \left(1 - 0,2 \cdot \frac{V_m}{V_c}\right)}{Q}, \quad (1)$$

$$P_e = \frac{0,6 \cdot \eta \cdot T \cdot S \cdot \left(1 - 0,2 \cdot \frac{V_m}{V_c}\right)}{Q} \cdot \int_{t_1}^{t_2} I(t) \cdot \cos \varphi(t) dt, \quad (2)$$

где η – КПД утилизации света (0,1–0,12), I – интенсивность света, Вт/м²; S – площадь светоприемной поверхности, м²; V_m и V_c – освещаемый и неосвещаемый объемы суспензии, м³; Q – калорийность 1 г биомассы в ккал, T – длительность светового дня в часах, φ – угол падения солнечного света, t_1 и t_2 – начало и конец светового дня.

Полученные в ходе расчёта результаты, масштабированные на 25 ФБР представлены в таблице.

Таблица
Результаты расчёта производительности комплекса СФБР

Параметр	Значение
Штамм МВ	<i>Chlorella sorokiniana</i>
Объём 25 ФБР, л	1475
Суммарная производственная площадь, м ²	114,7
Суммарная производительность, гсв*/сут.	1831,95
Поглощённый СО ₂ , л/сут.	1831,95
Выделенный кислород, кг/сут.	4,916
Потенциал выхода биотоплива, кг/сут.	8,317
Количество биомассы с 1 га, кгсв/сут.	159,7

* гсв – грамм сухого веса

Литература

- Мещерякова Ю. В., Нагорнов С. А. Культивирование микроводоросли хлорелла с целью получения биотоплива // Вопросы современной науки и практики. 2012. № 43. С. 33–36.
- Олескин А. В., Цао Боян. Микроводоросли как биотехнологические объекты // Вопросы современной альгологии. 2022. № 3 (30). С. 1–23
- Цоглин Л. Н., Пронина Н. А. Биотехнология микроводорослей. М. : Научный мир, 2012. 184 с.
- Cultivation of *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1 in Flat-Panel Photobioreactors: From a Laboratory to a Pilot Scale / D. A. Gabrielyan, M. A. Sinetova, B. V. Gabel [et al.] // Life. 2022. Vol. 12. Art. 1309.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *PANTOEA BRENNERI*, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК

Л. В. Сокольникова, Е. С. Беркутова, Д. С. Бульмакова,
А. Д. Сулейманова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, lidasok00@mail.ru

Штаммы *Pantoea brenneri* обладают широким спектром PGP-свойств. Они способны продуцировать индол-3-уксусную кислоту (ИУК), сидерофоры, разлагать труднорастворимые органические и неорганические соединения фосфора, образовывать биопленки, выделять ионы аммония и цианиды [Иткина, Сулейманова, Шарипова, 2021] и проявлять антагонистическую активность [Антагонистические штаммы ... , 2023; S Antifungal Activity ... , 2023]. Таким образом, штаммы *Pantoea brenneri* потенциально могут использоваться в качестве биоудобрений. Однако важной характеристикой таких микроорганизмов является способность к колонизации растений. Оценить ее можно путем создания флуоресцентно меченых штаммов. Таким образом, целью работы было получение и характеристика флуоресцентно меченых штаммов *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2.

Маркерные штаммы получали путем трансформации в их геном плазмиды pFPV25.1 td Tomato с помощью электропорации. Данный вектор несет в себе ген флуоресцентного белка Tomato и ген устойчивости к канамицину. Детекцию трансформации проводили на среде с добавлением канамицина, а также с помощью флуоресцентного микроскопа. Интересным представляло изучение продукции маркерного флуоресцентного белка клетками штаммов *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2 в различные часы роста культур. Измерения проводили на проточном цитометре при длине волны 670–735 нм на 12-й, 18-й и 24-й ч роста бактерий. Установили, что продукция маркерного белка Tomato обоими штаммами приходилась на 18-й ч культивирования. При этом количество флуоресцентно меченых клеток у штамма *P. brenneri* 3.2 составляло 83,9 %, а у штамма *P. brenneri* 3.5.2 – 73,3 % от общего числа клеток.

Поскольку экспрессия генов маркерного белка и гена устойчивости к антибиотикам накладывает дополнительную нагрузку на клетки штаммов, было необходимо изучить изменяются ли свойства нативного и флуоресцентно меченого штаммов. Динамику роста штаммов оценивали на среде LB. Измерения оптической плотности OD₆₀₀ проводили через каждые 4 ч в течение 3 сут. Пик роста культуры у всех штаммов приходил на 12-й ч культивирования, затем снижался и к 32-му часу выходил на плато.

Продукция ИУК является важным фактором колонизации ризосферы микроорганизмами [Genetic and Metabolomic ... , 2020]. Способность штаммов синтезировать ИУК проводили на среде LB с добавлением 4мМ

L-триптофана в течение 3 сут. Концентрацию ИУК измеряли с помощью реактива Сальковского. Максимальная продукция ИУК всеми штаммами приходилась на 10-й ч культивирования. При этом штамм *P. brenneri* 3.2 синтезировал ИУК больше, чем штамм *P. brenneri* 3.5.2. На 10-й ч культивирования штамм *P. brenneri* 3.2 продуцировал 31,5 мкг/мл, а штамм *P. brenneri* 3.5.2 – 22,9 мкг/мл. Различий в биосинтезе ИУК между нативными и трансформированными штаммами не наблюдалось.

Еще одним фактором колонизации является продукция бактериями сидерофоров [Iron dynamics in ... , 2009]. Способность штаммов образовывать сидерофоры оценивали на агаризованной среде CAS, содержащей краситель хром азурол S. Через 72 ч измеряли диаметры зон просветления вокруг колоний. Эксперименты не показали различий между штаммами *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2, а также между нативными и трансформированными штаммами.

Способность штаммов образовывать био пленки также является важным фактором колонизации ризосферы [Duca, Glick, 2020]. Био пленкообразование оценивали методом окрашивания кристаллическим фиолетовым. Все штаммы были способны формировать био пленки с максимумом на 48-й ч роста. При этом штамм *P. brenneri* 3.2 формировал био пленки в 1,5 раза эффективнее штамма *P. brenneri* 3.5.2. Различий в био пленкообразовании между нативными и трансформированными штаммами не было обнаружено.

Таким образом, были получены штаммы *P. brenneri* 3.2 и *P. brenneri* 3.5.2 с красным флуоресцентным белком Tomato. При этом наличие в геноме бактерий маркерного белка не повлияло на их динамику роста, а также на важные факторы колонизации, такие как выработка ИУК, продукция сидерофоров и био пленкообразование. В будущем будут проведены эксперименты на растениях, которые позволят оценить способность штаммов к их колонизации.

Работа финансирована грантом РФФ № 24-26-00289.

Литература

- Антагонистические штаммы *Pantoea brenneri* как средства защиты растений / Д. С. Бульмакова, Г. И. Шагиева, Д. Л. Иткина [и др.] // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57, № 5. С. 352–361.
- Иткина Д. Л., Сулейманова А. Д., Шарипова М. Р. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 204–214.
- Antifungal Activity of Siderophore Isolated from *Pantoea brenneri* Against *Fusarium oxysporum* / A. D. Suleimanova, L. V. Sokolnikova, E. A. Egorova [et al.] // Russ. J. Plant Physiol. 2023. Vol. 70. Art. 199.
- Duca D. R., Glick B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. Vol. 104. P. 8607–8619.
- Genetic and Metabolic Perspective on the Production of Indole-3-Acetic Acid by *Pantoea agglomerans* and Use of Their Metabolites as Biostimulants in Plant Nurseries / F. Luziatelli, A. G. Ficca, P. Bonini [et al.] // Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. P. 1475.
- Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes / P. Lemanceau, P. Bauer, S. Kraemer, J.-F. Briat // Plant and Soil. 2009. Vol. 321. P. 513–535.

АКТИНОБАКТЕРИИ: ГЕНЕТИКА, БИОХИМИЯ, ПЕРСПЕКТИВЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

И. П. Соляникова^{1,2}, Н. Е. Сузина¹, Т. Н. Абашина¹, В. Н. Поливцева¹,
Я. А. Делеган¹, Л. Р. Иминова¹, З. А. Асфха², И. А. Артемьева²,
В. М. Травкин²

¹ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, Пущино

²Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Россия, г. Белгород, Innas@ibpm.pushchino.ru

В современном агропромышленном комплексе и промышленности все более актуальное значение приобретает обработка способов применения биотехнологий для снижения нагрузки на окружающую среду. Одним из важнейшим направлений является разработка экологически безопасной системы защиты сельскохозяйственных культур от вредителей на основе активных микробных штаммов, способных контролировать рост и развитие фитопатогенов. Оптимальным является сочетание этой способности с выраженным стимулирующим воздействием на рост и развитие растений, совмещенное с повышением доступности для растений малорастворимых питательных компонентов. Таким образом, поиск таких микробных штаммов и обработка методов их применения являются целью работы многих исследовательских лабораторий. Наиболее перспективными в этой связи представляются почвенные микроорганизмы, в частности актиномицеты, широко представленные в почве благодаря их способности легко адаптироваться к среде обитания и довольствоваться органическими соединениями, которые непригодны для других микроорганизмов. По распространенности и видовому разнообразию актиномицетов, подавляющее большинство относится к роду *Streptomyces*. Они же синтезируют до 80 % охарактеризованных природных продуктов вторичного обмена веществ, представленных различными химическими структурами. Данная работа направлена на выделение и изучение представителей актиномицетов, которые могут быть эффективно применены для реализации экологически-чистого аграрного производства. Из почв и донных отложений, отобранных на территории Белгородской и Московской обл, Россия, и Эритреи, Африка, методом прямого наблюдения, фазово-контрастной микроскопии и методом секвенирования гена 16S рРНК отобрано 24 штамма, относящихся к Actinobacteria. В ходе предварительного анализа антимикробного действия из этих штаммов были отобраны 5 штаммов из рода *Streptomyces*: *Streptomyces tauricus* Act25, *Streptomyces* sp. ActVer, *Streptomyces anthocyanicus* IPS92w, *Streptomyces rubrogriseus* IPS92ro и *Streptomyces* sp. Lzd4kr. Для отобранных штаммов была проведена работа по оптимизации условий выращивания, отбора и дальнейшего хранения. При помощи трансмиссионной и сканирующей микроскопии

была охарактеризована тонкая организация мицелиальных форм перспективных штаммов. Проведенная полная сравнительная характеристика позволила определить оптимумы температуры, концентрации NaCl и pH, а также возможности утилизировать различные углеводы и чувствительность к антибиотикам. Наиболее ярко выраженное антимикробное действие проявил штамм *Streptomyces anthocyanicus* IPS92w. Штамм сохранял способность подавлять определенные тест-культуры независимо от состава среды и способа представления вторичных метаболитов: культуральная жидкость, сконцентрированная в 5 раз культуральная жидкость или экстракт органическим растворителем. Штамм IPS92w обладал широким диапазоном оптимумов роста для температуры, солености и pH. Анализ полного генома штамма *Streptomyces anthocyanicus* IPS92w позволил обнаружить в нем гены и генные кластеры, ответственные за широкий ряд антибиотиков и антибиотикоподобных соединений: 2-метилизоборнеол, альбафлавенон, дефероксамин, геосмин, изореньератен, целихелин, актинородин, гермицидин, ундецилпродигозин, ногаламицин, лейнамицин и целибактин. Таким образом, показано, что представители рода *Streptomyces* являются перспективными для разработки биологических средств защиты растений.

ГЕНОМНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ *PANTOEA BRENNERI*, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ БИОКОНТРОЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИИ

**А. Д. Сулейманова, Д. С. Пудова, Л. В. Сокольников,
М. Р. Шарипова**

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, aliya.kzn@gmail.com

Род *Pantoea* характеризуется высокой гетерогенностью – штаммы *Pantoea* встречаются в ассоциации с самыми разными хозяевами, включая растения, насекомых, животных и человека. Некоторые изоляты *Pantoea* являются фитопатогенными, в то же время другие, наоборот, производят противомикробные метаболиты и применяются в качестве биоудобрений, биофунгицидов и биопестицидов в агропроизводстве [Pantoea agglomerans ... , 2016]. Несмотря на множественные положительные свойства данного рода, среди его представителей встречаются как фитопатогенные, так и опасные для человека штаммы. В связи с этим остро стоит вопрос точной идентификации представителей рода *Pantoea* и определение маркерных элементов генома, позволяющих отличить полезные штаммы от вредоносных. Целью работы являлось определение генетических факторов, обуславливающих биоконтрольные свойства *Pantoea brenneri*, посредством сравнительного анализа геномов различных штаммов этого вида.

Изоляты *Pantoea* sp. 3.1, 3.5.1, 3.5.2 и 3.6.1 были ранее выделены нами из образца лесной почвы Республики Татарстан как продуценты фитазы. Штаммы были идентифицированы с помощью мультилокусного филогенетического анализ (MLSA) на основе 5 генов домашнего хозяйства бактерий, как *Pantoea brenneri*. Установлено, что выделенные изоляты обладали многочисленными свойствами, способствующими росту растений (PGP), а именно: секреции гидролитических ферментов, цианидов (HCN), а также продукции ауксина и сидерофоров [Phosphate Solubilization ... , 2023].

Геномы штаммов *P. brenneri* 3.1, 3.5.1, 3.5.2 и 3.6.1 были секвенированы. Сборку геномов осуществляли с использованием двух геномных сборщиков – SPAdes и Platanus. После чего проводили оценку качества сборки для каждого из геномов с помощью программы QUAST (табл.).

Таблица

Оценка качества сборки геномов *P. brenneri* разными геномными сборщиками с помощью программы QUAST

	3.1 sp	3.1 pl	3.5.1 sp	3.5.1 pl
Контиги (>500 п. н.)	22	18	18	18
Самый большой контиг	2 282 123	2 281 757	2 281 844	1 913 023
Общая длина	4 975 958	4 971 839	4 971 339	4 965 154
N ₅₀	606 263	606 110	707 138	606 379
GC (%)	55,76	55,76	55,77	55,77
N's	200	393	195	231
	3.5.2 sp	3.5.2 pl	3.6.1 sp	3.6.1 pl
Контиги, (>500 п. н.)	17	13	22	19
Самый большой контиг	2 282 083	2 281 228	2 282 365	1 286 462
Общая длина, Мб	4 256 178	4 251 612	4 976 165	4 971 060
N ₅₀	2 282 083	2 281 228	606 226	606 122
GC (%)	55,99	56	55,76	55,76
N's	200	0	300	82

Одним из критериев качества геномной сборки является метрика N₅₀, которая представляет собой длину контига, при которой все контиги большей длины дают в сумме 50 % от длины всего генома. Чем больше значение N₅₀, тем выше качество сборки [Mäkinen, Salmela, Ylinen, 2012]. Параметр N₅₀ для каждого из анализируемых геномов был выше при сборке с помощью программы SPAdes, Финальные сборки геномов с помощью программы SPAdes были депонированы в DDBJ/EMBL/GenBank под номерами доступа JBCGBG000000000.1, JMRT000000000.3, JBCGBN000000000.1 и JBCGBI000000000.1 для штаммов *P. brenneri* 3.1, 3.5.1, 3.5.2 и 3.6.1 соответственно.

Геномы были аннотированы с помощью NCBI Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline. Таким образом, нами получены полные сборки геномов штаммов *P. brenneri* 3.1, 3.5.1, 3.5.2 и 3.6.1 общей длиной 4 975 958 п. о., 4 971 339 п. о., 4 256 178 п. о. и 4 972 165 п. о. соответственно. Размер генома штамма 3.5.2 был более чем на 700 000 п. о. меньше, чем у остальных трех штаммов. Редуцированность данного генома отражается и в со-

кращенном количестве белок-кодирующих последовательностей (CDS) – их 4008, тогда как у штаммов 3.1, 3.5.1 и 3.6.1 их в среднем на 672 больше. Все штаммы имеют геномы со средним содержанием GC-пар около 56 %, что характерно для данного вида бактерий.

В базе данных Genbank представлено 30 подтвержденных геномов бактерий вида *P. breunneri*, которые включают 5 геномов клинических изолятов, 18 геномов *P. breunneri*, выделенных с поверхности Международной космической станции (МКС), 1 геном холобионта водорослей, 2 генома, выделенных из метагеномных сборок (MAGs), которые были собраны из образцов городских районов США. Единственными представителями почвенной микрофлоры среди этого вида являются изолированные нами штаммы. Далее мы сравнивали геномы этих штаммов с другими секвенированными геномами *P. breunneri*. Для выравнивания и последующего анализа мы использовали выборку из 11 доступных полногеномных последовательностей *P. breunneri*.

345 ортологичных белков уникальны для почвенных изолятов *P. breunneri* и отсутствовали у других близкородственных штаммов. Было подтверждено присутствие генов интеграз и транспозаз, что указывает на наличие профаговых областей в геномах этих штаммов. Среди общих CDS в штаммах 3.1, 3.5.1, 3.5.2 и 3.6.1 присутствовал набор регуляторных белков, включая регулятор транскрипции LuxR, который, совместно с белком LuxI, участвует в регуляции экспрессии генов межбактериальной коммуникации. В частности, влияет на синтез ацилированного гомосеринлактона (AHL), играющего ключевую роль в кворумсенсинге. Среди белков, специфичных для почвенных изолятов, было обнаружено множество генов, кодирующих устойчивость бактерий к тяжелым металлам в целом и в частности к мышьяку и меди.

В геномах почвенных изолятов было обнаружено два гена фитаз, отсутствующих у штаммов из других экониш – ген инозитолмонофосфатазы и гистидиновой кислой фосфатазы, отвечающие за гидролиз почвенных органических соединений фосфора. У *P. breunneri* присутствует полный кластер, отвечающий за производство и экспорт энтеробактериноподобного сидерофора. Кластер энтеробактериноподобных генов представляет собой локус ДНК размером около 20,0 Кб, содержащий 17 открытых рамок считывания. Мы провели сравнительный анализ этого кластера среди штаммов *P. breunneri*, который показал, что он идентичен во всех изученных геномах. Кроме того, энтеробактериноподобные кластеры у всех штаммов *P. breunneri* находятся в одном и том же геномном контексте. Локус типового штамма LMG_5343 показал 85 % нуклеотидной идентичности с локусами других штаммов, при этом количество генов осталось прежним. В геномах *P. breunneri* не было выявлено других генов производства и регуляции сидерофоров, кроме энтеробактериноподобного кластера.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00289.

Литература

Mäkinen V., Salmela L., Ylinen J. Normalized N50 assembly metric using gap-restricted co-linear chaining // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13. Art. 255.

Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects / J. Dutkiewicz, B. Mackiewicz, M. K. Lemieszek [et al.] // Ann. Agric. Environ. Med. 2016. Vol. 23, N 2. P. 206–222.

Phosphate Solubilization and Plant Growth Promotion by *Pantoea brenneri* Soil Isolates / A. Suleimanova, D. Bulmakova, L. Sokolnikova [et al.] // Microorganisms. 2023. Vol. 11, N 5. Art. 1136.

СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ И УРОВНЯ ЦИСТЕИНА У РАЗНЫХ ШТАММОВ *E. COLI*

Л. В. Сутормина, Г. В. Смирнова, О. Н. Октябрьский

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, lyubov-sutormina@mail.ru

Масштабное и неконтролируемое применение антибактериальных препаратов во многих сферах деятельности человека стало причиной возникновения и распространения резистентных форм микроорганизмов. В последние годы внимание исследователей направлено на птицеводство – как глобальный источник штаммов бактерий, обладающих множественной устойчивостью к антибиотикам [Avian Pathogenic ... , 2021]. Инфекционные заболевания, вызванные патогенными для птиц штаммами *Escherichia coli* (АРЕС), включая колибактериоз, являются одной из ведущих причин смертности птиц и приводят к серьезным экономическим потерям в птицеводстве. Поэтому изучение новых мишеней воздействия антибиотиков имеет решающее значение для поиска способов преодоления антибиотикорезистентности.

Перспективным направлением считается изучение влияния аминокислоты L-цистеина и ее производных на вирулентность бактерий, а также на их чувствительность к антибактериальным препаратам. Цистеин является компонентом белков и глутатиона, а также служит источником восстановленной серы для многих других органических молекул. Обладая высокой редокс-активностью за счет наличия сульфгидрильных групп он принимает важное участие в метаболических процессах клетки, включая регуляцию активности ферментов, клеточную сигнализацию и антиоксидантную защиту [Cysteine homeostasis ... , 2019]. На основании этого представляет интерес сравнить внутриклеточное содержание цистеина у устойчивых и чувствительных к антибиотикам штаммов бактерий.

Цель данной работы – сравнить чувствительность к ципрофлоксацину (ЦФ) и уровни внутриклеточного цистеина у лабораторного и АРЕС штаммов *E. coli*. В экспериментах использовались лабораторный штамм *Escherichia coli* BW25113 из коллекции Keio и штамм *E. coli* АРЕС L-5876, выделенный из птиц, больных колибактериозом, на птицефабриках Перм-

ского края. Исследуемые бактерии выращивали на минимальной среде М9 с 0,2 % глюкозой при 37 °С до OD_{600} 0,4. При достижении требуемой плотности в культуру вносили антибиотик ЦФ (3 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 ч. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) ципрофлоксацина определяли методом серийных разведений в 96-луночных планшетах. Уровень цистеина определяли по методу Gaitonde [1967].

Фторхинолон ципрофлоксацин является широко используемым препаратом для лечения бактериальных инфекций у сельскохозяйственных животных и птиц [The application of ... , 2019]. Лабораторный штамм BW25113 был чувствителен к ЦФ, минимальная ингибирующая концентрация на среде М9 составила 0,016 мкг/мл, тогда как штамм АРЕС L-5876 проявлял устойчивость ко всем изученным концентрациям антибиотика.

Исходная скорость роста штамма BW25113 в контрольных условиях была $0,59 \pm 0,03 \text{ ч}^{-1}$, когда у штамма L-5876 этот показатель на момент начала эксперимента был в 1,5 раза выше и составлял $0,87 \pm 0,03 \text{ ч}^{-1}$ (рис.).

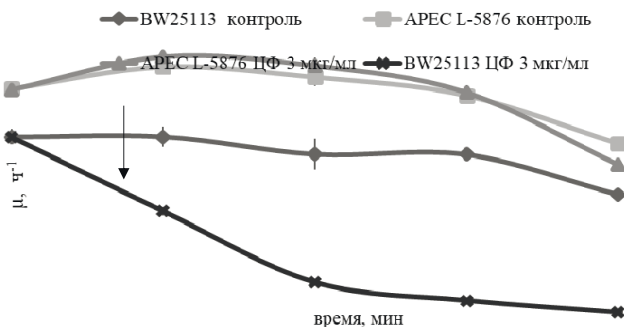


Рис. Влияние ципрофлоксацина на скорость роста исследуемых штаммов (момент добавления антибиотика показан стрелкой)

Добавление ЦФ в концентрации 3 мкг/мл ингибировало рост BW25113, и через 90 мин инкубации приводило к частичному лизису клеток. При обработке ципрофлоксацином в такой же концентрации скорость роста АРЕС L-5876 не отличалась от контроля (рис. 1).

В наших экспериментах исходная концентрация внутриклеточного цистеина у АРЕС L-5876 была в 1,64 раз выше, чем у BW25113, и составляла $0,166 \pm 0,007$ и $0,101 \pm 0,011 \mu\text{M}/OD_{600}$ у АРЕС L-5876 и BW25113 соответственно. Можно предположить, что повышенное содержание внутриклеточного цистеина у АРЕС L-5876 является одним из факторов, определяющих его устойчивость к ципрофлоксацину. Требуется дальнейшие исследования о влиянии цистеина и его производных на устойчивости бактерий к антибиотикам.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00093

Литература

Avian Pathogenic *Escherichia coli* (АПЕС): An Overview of Virulence and Pathogenesis Factors, Zoonotic Potential, and Control Strategies / Dipak Kathayat [et al.] // Pathogens. 2021. Vol. 10, N 4. Art. 467.

Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells / G. V. Smirnova, A. V. Tyulenev, K. V. Bezmaternykh [et al.] // Amino Acids. 2019. Vol. 51. P. 1577–1592.

Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // Biochem. 1967. Vol. 104. P. 627–633.

The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview / N. Roth, A. Kasbohrer, M. Sigrid [et al.] // Poul. Sci. 2019. Vol. 98, N 4. P. 1791–1804.

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ЦИСТИНА НА ПРОДУКЦИЮ СЕРОВОДОРОДА У ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ДЕФЕКТНЫХ ПО СИНТЕЗУ И ДЕГРАДАЦИИ ЦИСТЕИНА

А. В. Тюленев¹, Н. С. Жуланова^{1,2}, Г. В. Смирнова¹,
О. Н. Октябрьский¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, leksey333@yandex.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, nata.zhulanova02@mail.ru

В последнее время изучение гомеостаза цистеина в клетках бактерий вызывает все больший интерес исследователей. Находясь в свободном состоянии, цистеин может восстанавливать свободное железо (III) в реакции Фентона, в результате которой образуется токсичный гидроксильный радикал, вызывающий окислительное повреждение ДНК, белков и липидов [Park, Imlay, 2003]. К числу путей регуляции уровня цистеина у *Escherichia coli*, наряду с синтезом, относятся его транспорт, включение в состав глутатиона и деградация с образованием H₂S [The role of sulfides ... , 2018; Cysteine homeostasis ... , 2019].

Объект исследования – штаммы *E. coli* BW25113 (wt) и делеционные мутанты из коллекции Keio: JW2663 ($\Delta gshA$), дефектный по синтезу глутатиона, JW5518 ($\Delta cysA$), JW2505 ($\Delta mstA$) – по системам деградации цистеина и JW2414 ($\Delta cysM$) – по синтетазе II цистеина. Бактерии выращивались на среде M9 [Miller, 1972] с 0,15 % глюкозы в колбах на 250 мл в термостатируемом орбитальном шейкере (37°C, 150 об/мин). В качестве единственного источника серы в питательной среде использовался сульфат магния. Продукцию сульфида регистрировали непосредственно в колбах с растущей культурой с помощью системы сульфид-специфичного халькогенидного сенсора XC-S2-001 с рабочим диапазоном pH 6–12 и чувствительностью до 10⁻⁹ М («Сенсорные системы», Россия) и цифрового иономера срХ-2 (ИБП Пущино, Россия) в режиме реального времени

[The role of sulfides ... , 2018]. Оптическую плотность (OD_{600}) и удельную скорость роста (μ) определяли традиционными способами.

В контрольных условиях, при аэробном росте у всех испытуемых штаммов продукция H_2S поддерживалась на минимальном уровне, несколько увеличиваясь при переходе к микроаэробным условиям, когда количество растворенного кислорода, регистрируемое электродом Кларка, приближалось к нулевым значениям.

Избыток цистеина создавали однократным добавлением 30 мкМ цистина непосредственно в культуру в середине экспоненциальной фазы роста ($OD_{600} = 0,4$). Внесение цистина в среду, не содержащую клеток, не оказывало влияния на изменение потенциала сульфидного сенсора.

Через 15 мин после начала обработки наблюдалось снижение μ у всех штаммов с $0,72 \pm 0,01$ до $0,45 \pm 0,02$ ч⁻¹. В последующие 30 мин скорость роста восстанавливалась до нормального уровня, однако у штаммов, дефектных по синтезу глутатиона ($\Delta gshA$) и десульфидазе цистеина ($\Delta cysU$) отмечалось более продолжительное ингибирование роста.

Сразу после внесения цистина в среду регистрировалось резкое обратимое падение потенциала сульфид-специфичного сенсора, что указывало на возрастание продукции эндогенного H_2S . Судя по показаниям сульфид-специфичного сенсора, достоверные различия в количестве продуцируемого H_2S между штаммами отсутствовали, однако наблюдались значительные отличия в продолжительности времени его продукции. У родительского штамма BW25113 и мутанта, дефектного по десульфидазе MstA, усиленная продукция S^{2-} , определяемая по максимальному значению падения потенциала, поддерживалась на протяжении 60 мин с момента внесения цистина, у штаммов *cysM* и *gshA* – 80 мин, *cysU* – 100 мин.

Таким образом, у мутантов *E. coli*, растущих на минимальной среде с сульфатом и дефектных по синтезу глутатиона или цистеина, добавление цистина в среду значительно увеличивает продукцию эндогенного сульфида. Известно, что сульфид играет важную роль в устойчивости бактерий к стрессам. Наши результаты могут внести вклад в изучение процессов адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-14-00093.

Литература

- Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells. / G. V. Smirnova, A. V. Tyulenev, K. V. Bezmaternykh [et al.] // *Amino Acids*. 2019. Vol. 51. P. 1577–1592.
- Miller J. H. *Experiments in molecular genetics*. N. Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 p.
- Park S., Imlay J. A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185, N 6. P. 1942–1950.
- The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures / A. V. Tyulenev, G. V. Smirnova, N. G. Muzyka [et al.] // *Bioelectrochemistry*. 2018. Vol. 121. P. 11–17.

НОВЫЕ ЛИТИЧЕСКИЕ БАКТЕРИОФАГИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ИЗ ВОДОЕМОВ ПОВОЛЖЬЯ

М. С. Федорова, Г. И. Муталлапова, Л. Л. Ядыкова,
Е. Ю. Тризна, А. Р. Каюмов

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, MaSFedorova97@mail.ru

За последние десятилетия широкое распространение инфекционных заболеваний во всём мире обусловлено быстрым развитием бактериальной резистентности, вызванное активным использованием антибиотиков, поэтому поиск и разработка возможных подходов к повышению эффективности терапии инфекций является актуальной задачей. В настоящее время одним из наиболее распространенных мультирезистентных условно-патогенных бактерий и причиной множества инфекционных заболеваний во всем мире является *Pseudomonas aeruginosa*, способная вызывать инфекции благодаря различным факторам вирулентности. Эффективными адьювантами антибиотиков в отношении бактерий *P. aeruginosa* со множественной лекарственной устойчивостью могут стать бактериофаги, поскольку способность бактериофагов лизировать бактериальные клетки, как правило, не зависит от устойчивости последних к антибиотикам. Однако сами бактериофаги зачастую штаммоспецифичны, т. е. различные изоляты одной и той же бактерии могут быть нечувствительны к определенному бактериофагу, что требует создания коллекции бактериофагов. В данном исследовании выделяли бактериофагов из различных водоемов, для этого проводили отбор проб воды с последующей ступенчатой фильтрацией и наработкой чистой бактериофаговой культуры, вирулентной в отношении бактерий *P. aeruginosa*. Первым этапом оценивали вирулентные свойства полученных бактериофагов согласно стандартным методическим рекомендациям в отношении бактерий синегнойной палочки. На данный момент нами было выделено три бактериофага, наиболее эффективных в отношении бактерий *P. aeruginosa*. Следующим этапом оценивали штаммоспецифичность выделенных бактериофагов в отношении клинических изолятов бактерий *P. aeruginosa*. Так, все три бактериофага показали высокую литическую активность в отношении более 30 клинических изолятов *P. aeruginosa* (56 %, 77 %, 100 %). Кроме того, проверяли эффективность бактериофагов в сочетании с антибактериальными препаратами в отношении клинических изолятов бактерий *P. aeruginosa*. Было показано, что использование бактериофагов в сочетании с антимикробными препаратами повышает эффективность последних в отношении бактерий *P. aeruginosa*. В дальнейшем исследовании планируется идентификация единичных бактериофагов (описание морфологии, молекулярных характеристик).

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM2022-0017.

ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *BACILLUS PUMILUS* МЕТОДОМ CRISPR/CAS9 РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Д. И. Хасанов¹, Н. Л. Рудакова¹, Ю. В. Данилова¹, Ю. А. Васильева¹,
А. И. Гильмутдинова¹, Е. С., М. Р. Шарипова¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, hasda2149@gmail.com

Металлопротеиназа *B. pumilus* 3–19 (MprVp) была впервые выделена и охарактеризована учеными Казанского федерального университета. При работе с аминокислотной последовательностью новой протеиназы бацилл было установлено, что исследуемый фермент уникальным образом сочетает в себе классификационные признаки металлопротеиназ клана метцинкинов из двух разных семейств – эукариотических астацинов и адамализинов/репролизинов. Примечательно, что это первый прокариотический гомолог белков семейства адамализинов/репролизинов [A novel secreted ... , 2010]. Представители данных семейств участвуют в процессах регенерации, развитии эпителиальных тканей, эмбриогенезе и т. д. Тем не менее, гиперпродукция этих ферментов может являться маркерами различных патологий, а также приводить к таким заболеваниям, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца и др. [Zhong, Khalil, 2019; Malemud, 2019].

Также определено, что все адамализины эукариот представлены мультидоменными белками. Тем не менее каталитический домен является общим для всех представителей семейства. Структура активного центра металлопротеиназы *B. pumilus* 3–19 высококонсервативна и уникально сочетает в себе признаки семейств как адамализинов, так и астацинов. В связи с этим можно выдвинуть предположение о том, что металлопротеиназа *B. pumilus* 3–19 является эволюционно предковой формой для белков данных семейств, что в свою очередь формирует научный интерес к изучению функциональной роли исследуемого фермента у бацилл, а также к поиску потенциальных областей его применения.

На сегодняшний день роль исследуемого фермента в клетках *B. pumilus* 3–19 не изучена. Одним из подходов в понимании роли белков в клетке является сравнительный анализ делеционных мутантов по генам интереса с нативным штаммом.

Таким образом, целью настоящей работы явилось получение делеционного мутанта *B. pumilus* 3–19 по гену внеклеточной адамализиноподобной металлопротеиназы (*mprVp*) с использованием технологии редактирования генома CRISPR/Cas9.

В качестве CRISPR/Cas9 вектора для инактивации гена исследуемого фермента в работе использовали плазмиду pJOE9282.1 [Toymentseva, Altenbuchner, 2019]. Данный вектор характеризуется наличием температур-чувствительного ориджина репликации pE194^{ts} для клеток бацилл,

ориджином репликации pUC для *Escherichia coli*, геном устойчивости к канамицину, экспрессирующимся как в клетках *E. coli*, так и в бациллярных клетках, и гена *cas9* под контролем ксилозо-индуцибельного промотора P_{xyI}.

На базе данного вектора в работе была получена конструкция pKDm06.23, несущая такие индивидуальные компонентны для инактивации гена-мишени, как последовательность гидовой РНК (sgRNA), направляющей *cas9* к месту мишени, и фланкирующие последовательности делегируемого гена (*L,R-mprVp*) в качестве матрицы для гомологичной рекомбинации.

Готовую векторную конструкцию трансформировали в клетки *B. pumilus* 3–19 путем электропорации [Optimization of electroporation ... , 2022]. Для повышения эффективности трансформации в работе использовали антибиотик ампициллин в концентрации 20 мкг/мл в качестве агента, ослабляющего клеточные стенки бактерий. Антибиотик вносили на этапе наработки биомассы клеток за час до достижения культурой нужной оптической плотности для приготовления электрокомпетентных клеток.

Полученные подтвержденные колонии трансформантов отбирали для посева на чашки Петри со средой LA с 0,2 % ксилозой для индукции системы CRISPR/Cas9. Выросшие изолированные колонии отбирали для выделения геномной ДНК с целью подтверждения делеции гена интереса методом ПЦР с использованием праймеров к гену металлопротеиназы. Уменьшение размера ПЦР-продуктов в опыте в сравнении с размером нативного гена *mprVp* свидетельствовало об осуществлении делеции исследуемого гена в геноме *B. pumilus* 3–19.

Заключительным этапом явилось удаление сконструированного в работе вектора pKDm06.23 из клеток, полученных делеционных мутантов, за счет температура-чувствительного ориджина репликации pE194^{ts} для клеток бацилл.

Таким образом, результатом настоящей работы явилось получение мутантного штамма *B. pumilus* 3–19 с делегированным геном внеклеточной адамализиноподобной металлопротеиназы. Анализ физиологии полученного делеционного мутанта в сравнении с нативным штаммом позволит установить роль металлопротеиназы в клетках *B. pumilus* 3–19.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 23-24-10059.

Литература

- A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius* / A. R. Sabirova, N. L. Rudakova, N. P. Balaban [et al.] // FEBS letters. 2010. Vol. 584. P. 4419–4425.
- Characteristics of a novel secreted zinc-dependent endopeptidase of *Bacillus intermedius* / N. L. Rudakova, N. P. Balaban, Y. V. Danilova [et al.] // Biochemistry (Moscow). 2010. Vol. 75. P. 1294–1301.
- Malemud C. J. Inhibition of MMPs and ADAM/ADAMTS // Biochemical pharmacology. 2019. Vol. 165. P. 33–40.

Optimization of electroporation conditions for *Bacillus pumilus* 3–19 strain / I. V. Danilova, N. L. Rudakova, Y. A. Vasilyeva [et al.] // BioNanoScience. 2022. Vol. 12. P. 752–756.

Toymentseva A. A., Altenbuchner J. New CRISPR-Cas9 vectors for genetic modifications of *Bacillus* species // FEMS microbiology letters. 2019. Vol. 366.

Zhong S., Khalil R. A. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease // Biochemical pharmacology. 2019. Vol. 164. P. 188–204.

ДВЕ ПЕКТИНАЗЫ *P. VERSATILE* 3–2, *PelI* И *PehA* ВАЖНЫ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ ПЕКТИНОЛИЗА

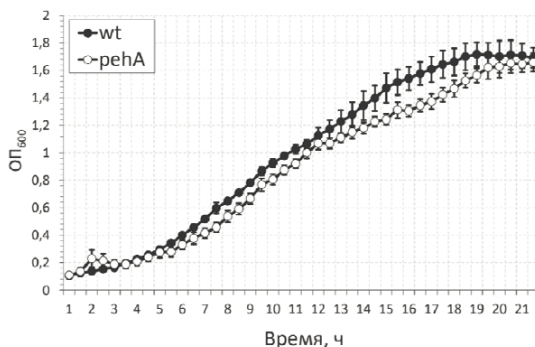
М. А. Шарангович, Е. А. Николайчик

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
msharangovichus@gmail.com

Пектин растительной клеточной стенки – сложный в структурном и химическом отношении полимер. Использование пектина в качестве источника углерода и энергии представителями *Pectobacterium* возможно благодаря системе деградации пектина, включающей широкий спектр пектиназ, и системам, обеспечивающим утилизацию пектиновых моносахаридов: галактуроновой кислоты, арабинозы, ксилозы и др. Использование этих систем происходит сообразно физико-химическим условиям среды и доступности субстратов на конкретном этапе развития инфекционного процесса. Контроль обеспечивается транскрипционными регуляторами.

В работе [Kravchenko, 2021] была продемонстрирована противофазная экспрессия дивергентно транскрибируемых генов *pell* и *pehA*, опосредованная регулятором PhoP. PhoP обладает активаторным действием в отношении *pehA* (полигалактуроназа) и репрессорным в отношении *pell* (пектатлиаза). Для полигалактуроназы *PehA* оптимальное значение pH составляет 5,5 [Structural analysis ... , 1990]. Оптимальные для работы пектатлиаз пектобактерий значения pH лежат в диапазоне 9–10 [Шевчик, Евтушенков, Фомичёв, 1988]. Ферментативный путь с образованием бутандиола позволяет бактерии защелачивать растительные ткани. Накопление бутандиола происходит в симптоматической фазе инфекции [Massive production ... , 2011]. Катионы Ca^{2+} и Mg^{2+} модулируют активность регулятора PhoP. Ca^{2+} высвобождается по мере разрушения растительной клеточной стенки, и роль основной пектиназы переходит от *PehA* к *PelI*.

Чтобы показать, что такая регуляция имеет биологический смысл для фитопатогена, в данной работе на основе *P. versatile* 3–2 были сконструированы штаммы с инсерционной инактивацией генов *pell* и *pehA*. Инактивация *pehA* снижала вирулентность *P. versatile* в листьях пекинской капусты при малой инокулирующей дозе (10^3 клеток в инокуляте). Мутант *pehA* демонстрировал диауксический характер роста в смешанной среде, содержащей глицерин и полигалактуронат натрия (рис. 1). Совместно эти данные указывают на роль *PehA* в инициации пектинолиза.

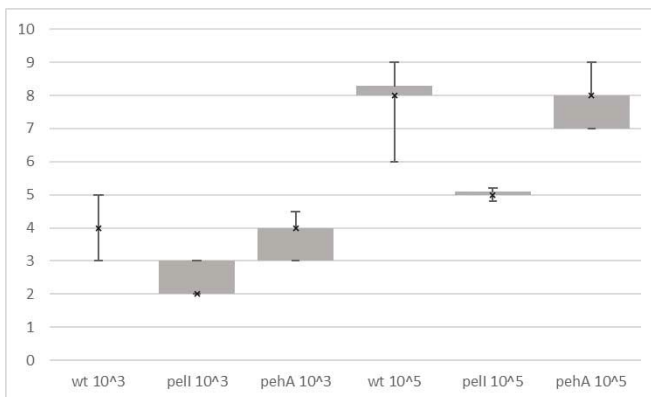


Указаны средние значения и стандартные отклонения по трём независимым повторам.

Рис. 1. Кривые роста культур в минимальной солевой среде с 0,5 % полигалактуронатом натрия и 0,2 % глицерином

Предварительная обработка листьев щелочным раствором делала их более устойчивыми к мутанту *pell* при инокулирующих дозах 10^3 и 10^5 клеток, что указывает на роль *PelI* в поддержании пектинолиза в щелочных условиях (рис. 2).

Таким образом, модель регуляции *pell/pehA* посредством *PhoP*, предложенная в [The *PhoPQ* Two-Component ... , 2021], согласно данным настоящей работы биологически оправдана.



Крестик – медиана, границы ящика – первый и третий квартили распределения, усы – максимальное и минимальное значения. Разница между вирулентностью *pell*-мутанта и других штаммов статистически достоверна ($p < 0,05$ согласно тесту Крускала-Уоллиса).

Рис. 2. Выраженная в баллах вирулентность штаммов в листьях пекинской капусты при инокулирующей дозе 10^3 или 10^5 КОЕ/мл

Работа выполнена при поддержке Министерства образования Республики Беларусь (проект № 20241129).

Литература

Шевчик В., Евтушенков А., Фомичёв Ю. Изоферменты внеклеточных пектатлиаз бактерий рода *Erwinia* // Изоферменты Внеклеточных Пектатлиаз Бактерий Рода *Erwinia*. 1988. Т. 53, № 10. С. 1628–1638.

Massive production of butanediol during plant infection by phytopathogenic bacteria of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium* / G. Effantin, C. Rivasseau, M. Gromova, [et al.] // *Mol. Microbiol.* 2011. Vol. 82. P. 988–997.

The PhoPQ Two-Component System Is the Major Regulator of Cell Surface Properties, Stress Responses and Plant-Derived Substrate Utilisation During Development of *Pectobacterium versatile*-Host Plant Pathosystems / U. Kravchenko, N. Gogoleva, N. Kalubaka [et al.] // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 11. Art. 621391.

Structural analysis of the *pehA* gene and characterization of its protein product, endopolygalacturonase, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* / H. T. Saarihahti, P. Heino, R. Pakkanen [et al.] // *Mol. Microbiol.* 1990a. Vol. 4. P. 1037–1044.

АНАЛИЗ НАЛИЧИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У БАКТЕРИЙ ГРУППЫ ESKAPEE С ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Л. Л. Ядыкова¹, Л. Т. Баязитова², А. Р. Каюмов¹,
Е. Ю. Тризна¹, Д. А. Зыкова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, milayesyad@gmail.com

²Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии, Казань, bajalt@mail.ru

Условно-патогенные бактерии группы ESKAPEE выделяют на фоне других условных патогенов своей способностью быстро адаптироваться и приобретать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) к используемым антимикробным препаратам. Среди группы грамотрицательных бактерий ESKAPEE наблюдается более часто обнаруживаемыми возбудителями заболеваний *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Синегнойная палочка известна своей МЛУ, опосредованной внутренней устойчивостью к антибиотикам, вследствие сниженной проницаемости ее клеточной стенки и экспрессией насосных систем оттока органических веществ. *K. pneumoniae* является ключевым патогеном поражающим людей и одним из основных источников внутрибольничных инфекций, связанных с высокой заболеваемостью и смертностью. У *K. pneumoniae* наиболее часто встречается устойчивость к карбопенемам. *E. coli* способна вызывать острые кишечные инфекции, воспаления мочевой и половой систем, поражения тканей мозга и сепсиса. На данный момент кишечная палочка показывает сильный рост устойчивости к бета-

лактамным антибиотикам. Также у *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *E. coli* наблюдается активное образование биопленок, что позволяет выживать под действием антибиотиков чувствительным клеткам.

Мы провели сравнительную оценку наличия фенотипической устойчивости штаммов бактерий *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* и наличия у них генов устойчивости к антибактериальным препаратам.

В работе были исследованы клинические изоляты *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *E. coli*, взятые у пациентов с различными инфекционными заболеваниями. Изоляты были предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии.

Фенотипическую оценку проводили с помощью диско-диффузионного метода по рекомендациям МАКМАХ и EUCAST. Чувствительность штаммов проверяли к различным антибиотикам из классов пенициллинов, цефалоспоринов, карбопенемов, монобактамов, аминогликозидов и фторхинолонов. Результаты интерпретировали с помощью платформы AMRmap. Генетическую оценку проводили с помощью ПЦР. Для этого выделили геномную ДНК из изолятов с использованием фенол-хлороформа. С помощью ПЦР проводили поиск следующих генов: *texB*, *texD*, *texY*, *ampC*, *aac3-IIa*, *aphA1*, *aadB*, *rpsL*. Идентифицировали продукты амплификации с помощью гель-электрофореза.

Присутствие генов устойчивости к антибиотикам наблюдалось у большинства исследуемых штаммов с подтвержденным статусом резистентности. В то же время количество фенотипически устойчивых клинических изолятов превосходило численность изолятов с найденными генами устойчивости к антибиотикам. Вместе с тем мы наблюдали долю штаммов с генетической резистентностью и фенотипической чувствительностью.

Наличие генов устойчивости к антибиотикам (в частности, к аминогликозидам) у штаммов без фенотипической резистентности заинтересовало провести анализ на экспрессию этих генов в будущем. Различия между фенотипическим проявлением и наличием генов устойчивости могут говорить о возможном возникновении альтернативных методов защиты бактерий.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ МИНЕРАЛЬНО-ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МЯСНОЙ ПТИЦЫ

Д. Р. Яруллина¹, Е. А. Гаврилова¹, А. М. Ежкова², В. О. Ежков²,
Е. В. Никитина^{1,3}, Р. А. Волков², А. Р. Каюмов¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, public.mail@kpfu.ru, kasfes@gmail.com

²Казанская государственная академия ветеринарной медицины
им. Н. Э. Баумана, Казань, kgavm_baumana@mail.ru

³Казанский национальный исследовательский технологический университет
Казань, office@kstu.ru

В связи с трендом на переход к органическому сельскому хозяйству, интенсивно развивается разработка нового поколения экологически безопасных препаратов-пробиотиков, использование которых будет способствовать обеспечению биологической защиты и высокой продуктивности сельскохозяйственных животных и птиц. Особое значение биологические препараты приобретают в связи с усиливающейся техногенной и антропогенной нагрузкой на организм животных, особенно в условиях промышленного содержания. Пробиотики часто рассматриваются как альтернатива антибиотикам, которые уже запрещены к использованию в составе сельскохозяйственных кормов в странах Евросоюза и ограничиваются к применению на территории Российской Федерации. Показано, что добавление пробиотиков в рацион сельскохозяйственной птицы в качестве стимуляторов роста улучшает показатели роста, яйценоскость несушек, эффективность конверсии корма, иммунные реакции, в частности, устойчивость к энтеропатогенам. Основные механизмы действия пробиотиков включают конкурентное исключение патогенов, выработку антибактериальных веществ (органических кислот и бактериоцинов) и иммуномодулирующую активность в организме хозяина. Усилить благотворные эффекты пробиотиков можно за счет создания синбиотиков, в которых полезные свойства пробиотических бактерий усилены ценными характеристиками других компонентов (чаще всего пребиотических, т. е. стимулирующих развитие нормофлоры кишечника). Целью данной работы является разработка подходов к включению комплекса пробиотических молочнокислых бактерий (МКБ) в трехмерную структуру минерального сорбента-носителя из группы природных агроминералов (цеолита и бентонита) и оценка эффективности применения разработанных синбиотических иммобилизованных препаратов в условиях *in vivo* на сельскохозяйственной птице (перепелах).

Среди более 100 штаммов МКБ из собственной коллекции мы отобрали три штамма с выраженной пробиотической активностью: кишечный изолят *Limosilactobacillus fermentum* HFD1 и выделенные из расти-

тельного сырья *Lactiplantibacillus plantarum* FCa3L и *Lactiplantibacillus plantarum* AG10. Показали, что данные лактобактерии не оказывают влияния на рост друг друга и могут успешно применяться в составе жидкого мультиштаммового препарата. Разработали питательную основу для культивирования МКБ с использованием отходов пищевых производств (сухой молочной сыворотки и свекловичной клетчатки), которая кроме того, что обеспечивает потребности микроорганизмов в питательных веществах, формирует оптимальную систему с сорбционным компонентом. В качестве минеральной основы препарата использовали минералы месторождений Республики Татарстан: бентонит Тарн-Варского месторождения Нурлатского района РТ и цеолит Татарско-Шатрашанского месторождения Дрожжановского района РТ. Результаты анализа их химического и минерального состава, емкости катионного обмена, сорбционной активности, а также структуры ионообменного и сорбционного комплекса, указывают на потенциально высокие ионообменные и сорбционные свойства.

Разработали способ получения жидкого иммобилизованного синбиотического препарата. Экспериментально доказали, что в препарате клетки лактобактерий и частицы агроминералов находятся в непосредственном контакте между собой, причем бактерии образуют микроколонии на поверхности частиц носителя. МКБ, составляющие пробиотическую композицию препарата, сохранялись в высоких титрах – 10^8 – 10^9 КОЕ/мл и выше – при хранении препарата при постоянной температуре $+4\pm 1$ °С (долгосрочные тесты стабильности, UST) или 20 ± 1 °С, а при $+37\pm 1$ °С (ускоренные тесты стабильности, HST) жизнеспособность существенно (более чем на 2 порядка) снижалась как у контрольных неиммобилизованных клеток, так и у лактобацилл, иммобилизованных на агроминералах. В качестве реперных показателей влияния иммобилизации на агроминералах на физиологический статус лактокомпонента препарата-синбиотика рассмотрели кислотообразующую способность МКБ, антиоксидантный потенциал, хелатирующая активность, восстановительную силу и активность ферментных систем метаболизма белков, углеводов и липидов. Полученные результаты указывают на активное физиологическое состояние МКБ в составе жидкого иммобилизованного синбиотического препарата.

Разработанные синбиотические препараты в течение длительного времени (4–9 недель) вводили перепелам мясного направления продуктивности породы Техасский белый в составе кормового рациона в условиях стандартного полнорационного кормления птиц, а также на фоне дефицита микроэлементов и витаминов в кормовом рационе. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 40, 09.03.2023). В течение эксперимента учитывали сохранность поголовья, клинико-физиологическое состояние птиц, морфо-биохимические показатели крови, среднесуточный прирост живой массы, биоконверсию корма, яйценоскость и другие параметры. При оценке качества продукции выполнена ветеринарно-санитарная оценка мяса и яиц с определением ор-

ганолептических показателей, химического состава, физико-химических и структурно-механических свойств, технологических показателей (влагоудерживающей способности и кулинарных потерь для мяса грудной мышцы) и микробиологической безопасности. Послеубойная ветеринарно-санитарная оценка тушек перепелов с морфометрией внутренних органов указывала на то, что прием новых синбиотических кормовых добавок не вызывал отклонений и патологических изменений как на уровне организма, так и на уровне отдельных органов. Сохранность поголовья составила 100 % во всех группах. Для гистологических исследований использовали образцы желудка, 12-перстной кишки, печени и селезенки перепелов.

Поскольку состав кишечной микробиоты является одним из определяющих факторов состояния макроорганизма, исследовали влияние приема синбиотиков на микробиом слепой кишки перепелов методом секвенирования последовательностей гена 16S рибосомной РНК на платформе Illumina MiSeq. У перепелов, получавших синбиотики, выявлены определенные положительные изменения в микробиоте кишечника, которые могут вести к улучшению физиологических и морфологических параметров перепелов. Полученные данные существенно дополняют имеющиеся достаточно скудные представления о составе кишечной микробиоты перепелов. Ряд таксонов был идентифицирован у перепелов впервые.

Полученные результаты позволяют научно обосновать и оптимизировать использование пробиотиков и агроминералов, а также их комбинаций (синбиотиков) в рационах кормления сельскохозяйственных птиц для более полного раскрытия их биологического потенциала, повышения их продуктивности и безопасности получаемой сельскохозяйственной продукции. Разработанные синбиотические препараты представляют собой перспективные кормовые добавки комплексного действия для птицеводческого сектора сельского хозяйства РФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект РНФ-22-16-00040).

Секция 3

РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ СИСТЕМЫ

ПОВЕДЕНИЕ As И БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ P И Si ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ РИЗОБАКТЕРИЙ В СИСТЕМЕ «ПОЧВА – РАСТЕНИЕ»

Б. А. Баенгуев, Г. А. Белоголова, О. Н. Гордеева

Институт геохимии им. А. П. Виноградова СО РАН
Иркутск, baenguev@igc.irk.ru

Как известно, растения и микроорганизмы играют непосредственную роль в миграции химических элементов. В настоящее время считается перспективным использование ризосферных бактерий PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), обладающих рядом полезных для растений свойств. Остается малоизученным вопрос о влиянии бактериальных биопрепаратов на поведение химических элементов в почве.

Целью данного исследования являлось изучение особенностей поведения As и биогенных элементов P и Si в системе «почва – растение» под влиянием ризобактерий *Azotobacter* и *Bacillus* в техногенных почвах г. Свирска. Одним из градообразующих предприятий города был Ангарский металлургический завод (АМЗ), который вплоть до 1949 г. занимался выпуском мышьяка для оборонной промышленности. Оставшиеся после закрытия завода руины и отвалы огарков представляли значительную экологическую опасность, так как содержали большую концентрацию мышьяка, свинца и других ТМ. По результатам ранее проведенных эколого-геохимических исследований в г. Свирске выявлено мышьяковое загрязнение не только на территории бывшего АМЗ, но и на большей территории города [Гордеева, Белоголова, Гребенщикова, 2010]. Пробы почв были отобраны на двух участках. Участок 1 – в 500 м от источника загрязнения (огородная почва), участок 2 – техногенная почва в 10 м от отвалов АМЗ г. Свирска. Полученные пробы почв были разделены на контрольные и опытные. Опытные образцы подверглись обработке биопрепаратами Фосфобактерина (*Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum*, штамм PI-04, АСМ В-2357 D) и Кремнебактерина (*Bacillus mucilaginosus*, штамм АСМ В-1574), разработанных на основе ризобактерий рода *Bacillus* в Томском госуниверситете [Вайшля, Ведерникова, Бондаренко, 2007]. Совместно с Сибирским институтом физиологии и биохимии растений СО РАН проводилось выращивание растений (овес, пшеница, горох, ре-

дис) в фитотроне. Пробы растений не достигли зрелого состояния, так как после 37 дней роста на техногенных почвах они начали высыхать. В почвах, на которых выросли растения, изучено валовое распределение концентраций As, P и Si и проанализированы постадийные вытяжки As из почв по методике [Кузнецов, Шимко, 1990].

Анализ почвенных образцов проводили методом атомной абсорбции на атомно-абсорбционных спектрометрах модели 403 и 503 фирмы Perkin-Elmer. Химический состав проб растений определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ISP – MS).

Процентное распределение содержания As относительно суммы выделенных фракций для почвы, на которой выращивался овес, показано на рисунке. Выявлено, что мышьяк обладает высокой подвижностью, так как в ионно-обменной фракции процент содержания может достигать до 40 % от суммы всех фракций. Потенциально подвижные формы мышьяка (специфически сорбированная и органическая фракции) также характеризуются высоким процентным содержанием As. В контрольной почве (без бактерий) наблюдается повышенная мобилизация мышьяка на участке 1, имеющем сельскохозяйственное значение, относительно техногенного участка 2.

Мышьяк в техногенном грунте представлен в виде разрушенных сульфидных минералов, преимущественно арсенопирита и других вторичных минералов, поэтому As обладал невысокой подвижностью. Это показано в контрольной почве (рис.). При инокуляции почв отвала ризобактериями *B. megaterium* var. *phosphaticum* минимальный процент мышьяка выделялся в твердом остатке и силикатной фракции. Одновременно увеличивается его концентрация во фракциях, связанных с гидроксидами железа и более подвижными фракциями, в отличие от контрольной почвы данного участка. Это указывает на усиление миграционной активности As под влиянием *B. megaterium* var. *phosphaticum*, который инициирует мобилизацию минерально-связанного мышьяка в ризосфере (рис.).

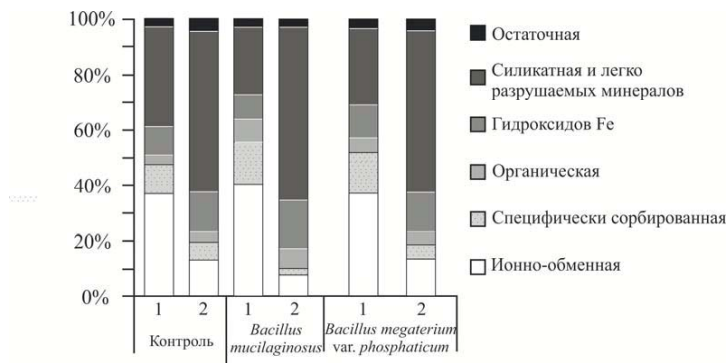


Рис. Процентное содержание As (в процентах от суммы фракций) в окультуренной (1) и техногенной почвах (2) после выращивания растений. Контроль – без бактерий, опыт – со штаммами ризобактерий

У растений, выращенных на почве с ризобактериями, средняя концентрация As относительно контроля увеличивается. В основном, это связано с накоплением мышьяка в корнях растений. В надземной части растений на огородных почвах содержание мышьяка снижается или незначительно отличается от контрольного значения. В растениях, выращенных под влиянием *B. megaterium* var. *phosphaticum* на техногенном участке отмечено высокое содержание As.

Фосфобактерин способен мобилизовать фосфор из нерастворимой фракции в доступную для растений форму. В настоящем эксперименте эти бактерии не инициировали накопление фосфора в растениях. Содержание P снизилось или незначительно отличалось от контрольного состояния. Однако ризобактерии, особенно штамм *B. muciliginosus*, способствовали перемещению Si в растения. Известно, что в ряде случаев As поглощается бактериями вместо фосфора [Arsenic in the Evolution ... , 2009]. Снижение фосфора у растений с высокой концентрацией мышьяка может быть связано с токсическим стрессом и межэлементным взаимодействием этих элементов. В результате мышьяк конкурирует с фосфором в растениях. Таким образом, мышьяк может быть антагонистом фосфора. Межэлементные взаимодействия между этими элементами могут влиять и на обмен веществ в самом растении. Сделан вывод, что *B. megaterium* var. *phosphaticum* обладает высокой устойчивостью к высоким концентрациям мышьяка и при этом, в отличие от кремния, практически не влияет на транслокацию фосфора в растения в условиях техногенного загрязнения почв мышьяком.

Литература

Вайшля О. Б., Ведерникова А. А., Бондаренко А. П. Микробиологические аспекты гипергенеза : учеб. пособие для вузов. Томск : ТМЛ-Пресс, 2007. 288 с.

Гордеева О. Н., Белоголова Б. А., Гребенщикова В. И. Распределение и миграция тяжелых металлов и мышьяка в системе «почва – растение» в условиях г. Свирска (Южное Прибайкалье) // Проблемы региональной экологии. 2010. № 3. С. 108–113.

Кузнецов В. А., Шимко Г. А. Метод постадийных вытяжек при геохимических исследованиях. Минск : Наука и техника, 1990. 88 с.

Arsenic in the Evolution of Earth and Extraterrestrial Ecosystems / R. S. Oremland, W. S. Chad, F. Wolfe-Simon [et al.] // Geomicrobiology. 2009. Vol. 26. P. 522–536.

БИОКОНТРОЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ АБК-УТИЛИЗИРУЮЩЕЙ РИЗОБАКТЕРИИ *RHODOCOCCLUS* SP. P1Y ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ПРОРОСТКОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА АБК-ПРОДУЦИРУЮЩИМ ГРИБОМ *BOTRYTIS* SP. ВА3

А. А. Белимов¹, А. И. Шапошников¹, Т. С. Азарова¹,
Н. А. Вишневецкая¹, Э. А. Сексте¹, В. Ю. Шахназарова¹, А. А. Бутин¹,
М. И. Лебединский¹, О. С. Юзихин¹, Ю. В. Гоголев²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, Санкт-Петербург, belimov@arriam.ru

²Казанский научный центр РАН, Казань, gogolev.yuri@gmail.com

Абсцизовая кислота (АБК) – фитогормон, участвующий во многих физиологических, биохимических и ростовых процессах растений, и играющий важную роль в адаптации растений к биотическим и абиотическим стрессам. Ассоциированные с растениями микроорганизмы способны утилизировать или синтезировать АБК. Однако роль этих свойств микроорганизмов в жизни растений малоизучена. Штамм *Rhodococcus* sp. P1Y стимулирует рост растений и метаболизирует АБК последовательно до дегидровомифолиола и родококковой кислоты [Isolation and characterization ... , 2022]. Фитопатогенные грибы, в том числе штамм *Botrytis* sp. ВА3, продуцируют АБК [The ability of some ... , 2019]. Имеются сведения о противодействии высоких концентраций АБК формированию эффективной защитной реакции растений на атаку фитопатогенов [Cao, Yoshioka, Desveaux ... , 2011]. Целью данного исследования являлось определение роли бактерий *Rhodococcus* sp. P1Y во взаимодействии *Botrytis* sp. ВА3 и растений. Для этого была проведена серия экспериментов, в которых молодые растения подсолнечника обрабатывали экзогенной АБК и/или инокулировали указанными микроорганизмами и выращивали в течение 10 сут. в строго контролируемых условиях гидропонной гнотобиотической системы. Подобраны рабочие концентрации экзогенной АБК в диапазоне от 0,1 до 50 мкмоль для изучения растительно-микробных взаимодействий. Биомасса побега уменьшалась пропорционально увеличению концентрации АБК в среде, свидетельствуя об ингибирующем действии этого фитогормона на рост растений в условиях эксперимента. Инокуляция *Rhodococcus* sp. P1Y не влияла, а инокуляция *Botrytis* sp. ВА3 ингибировала рост корней и побегов у необработанных АБК растений. Стимуляция роста корней и побегов обнаружена при инокуляции штаммом *Rhodococcus* sp. P1Y у инокулированных грибом *Botrytis* sp. ВА3 и обработанных экзогенной АБК растений. В ассоциации с растениями подсолнечника бактерии *Rhodococcus* sp. P1Y утилизировали в питательном растворе экзогенную АБК, источником которой были химически чистое вещество и метаболит гриба *Botrytis* sp. ВА3. Это свидетельствовало о том, что биоконтрольный эффект бактерий связан с утилизацией грибной АБК.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 24-16-00166).

Литература

Cao F. Y., Yoshioka K., Desveaux D. The roles of ABA in plant-pathogen interactions // Journal of Plant Research. 2011. Vol. 124, N 4. P. 489–499.

Isolation and characterization of 1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexene-1-acetic acid, a metabolite in bacterial transformation of abscisic acid / O. S. Yuzikhin, A. I. Shaposhnikov, T. A. Konnova [et al.] // Biomolecules. 2022. Vol. 12. Art. 1508.

The ability of some species of phytopathogenic fungi to produce abscisic acid / D. S. Syrova, A. I. Shaposhnikov, N. M. Makarova [et al.] // Mycology and Phytopathology. 2019. Vol. 53, N 5. P. 301–310.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИОЛЬХОНСКИХ СТЕПЕЙ КАК СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

**И. А. Васильев¹, М. С. Карпова¹, А. С. Казаева²,
Д. А. Кривенко¹, Ю. А. Маркова¹**

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, juliam06@mail.ru

²Иркутский государственный университет, Иркутск

Микроорганизмы, населяющие экосистемы со сложными климатическими условиями могут обладать уникальными адаптациями которые делают их перспективными объектами для дальнейшего изучения. Ольхонский район Иркутской области характеризуется аридным климатом и почвами с низким содержанием углерода. Своеобразие этого региона, а также относительно слабое антропогенное воздействие способствует сохранению эндемичных растений. Объектом нашего изучения являлись бактерии, ассоциированные с узколокальным эндемиком копеечником зундукским (*Hedysarum zundukii Peschkova*). Бактерии взаимодействуют с растением-хозяином с помощью прямых (фиксация азота, солюбилизация фосфатов, синтез фитогормонов) и косвенных механизмов (индукция системной резистентности или конкуренция за пространство через образование биопленок). В результате они оказывают положительное влияние на всхожесть семян, обеспечивают эффективное минеральное питание и регуляцию роста как корневой системы, так и надземных частей растения [Jha, Saraf, 2015; Kaushal, 2019; Mantelin S., Touraine, 2004]. Микроорганизмы засушливых регионов могут вырабатывают уникальные ферменты и биологически активные соединения, способствующие лучшей выживаемости сельскохозяйственных культур в условиях засухи [Mohammadipanah, Wink, 2016]. Таким образом, целью работы было изучение свойств микроорганизмов, выделенных из ризо- и эндосферы копеечника

зундукского (*Hedysarum zundukii Peschkova*), для выявления перспективных стимуляторов роста и развития растений.

Объекты и методы исследования. Выделенные изоляты тестировали на способность растворять ортофосфат кальция [Anand, Kumari, Mallick, 2016], синтезировать ауксины [The importance of ... , 2015]. Наиболее перспективные штаммы были идентифицированы по 16S РНК.

Для оценки влияния выбранных штаммов на растения использовали семена яровой пшеницы сорта «Ирень». Предварительно простерилизованные семена замачивали на 6 ч в суспензии бактерий содержащих от $20 \cdot 10^3$ до $20 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Семена помещали в климатическую камеру Binder KBWF 240 (освещение 16 ч 30 мин, начало дня 4:50, окончание 21:20; $T_{\text{день}}$ 27 °С, $T_{\text{ночь}}$ 15 °С, влажность воздуха 40 %) на две недели.

Результаты и обсуждение. Всего было выделено 60 культур, относящихся к более чем 30 родам, таким как *Lysobacter*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Cytococcus*, *Variovorax*, *Rhodococci* и др.

Способность к синтезу ИУК была обнаружена у 19 штаммов. При этом у двух штаммов (Hz-15 и Hz-19) интенсивность окраски была наивысшей.

Фосфатсолубилизация выявлена у 14 штаммов. При этом скорость протекания реакции различалась. Так, у Hz-8, 18, 19 зона просветления появилась уже на 3-и сут., тогда как для штаммов Hz-48 и Hz-11 видимые результаты появились лишь через 7 сут.

В результате культивирования микроорганизмов на полужидком агаре 18 штаммов (около 30 % от исследуемых микроорганизмов) не проявили выраженной двигательной активности. Остальные штаммы демонстрировали чётко видимый диффузионный рост от краёв зоны укола к периферии пробирки. Стоит заметить, что наибольшей скоростью разрастания обладал штамм Hz-7.

В исследовании влияния микроорганизмов на рост и развитие проростков пшеницы было использовано семь штаммов, способных к синтезу ИУК и фосфатсолубилизации. Это *Bacillus mycoides* (Hz-7), *Pseudomonas sp.* (Hz-11), *Pseudomonas sp* (Hz-19), *Streptomyces sp.* (Hz-21), *Mycolicibacterium sp.* (Hz-35-2), *Phyllobacterium sp.* (Hz-48), *Pantoea sp.* (Hz-68-2).

Обработка суспензией микроорганизмов семян пшеницы показала следующее.

При обработке семян штаммами Hz-7, Hz19, Hz48 в концентрации $20 \cdot 10^5$ КОЕ/мл в всхожесть в среднем возрастала на 10 %.

Штаммы стимулировали развитие корневой системы на Hz-7 10,5 % при КОЕ $20 \cdot 10^3$ (статистически значимая разница ($p \leq 0,001$)); Hz-19 48,4 % КОЕ $20 \cdot 10^5$ (статистически значимая разница ($p \leq 0,001$)); Hz35-2 на 17,7 при КОЕ $20 \cdot 10^7$ (статистически значимая разница ($p \leq 0,001$)).

Увеличение надземной части наблюдалось у растений, обработанных штаммами Hz-7 на 13,1 % при КОЕ $20 \cdot 10^8$ (статистически значимая разница ($p \leq 0,001$)); Hz-11 на 13,4 % при КОЕ $30 \cdot 10^3$ (статистически значимая разница ($p \leq 0,001$)); Hz35-2 на 8,7 % при КОЕ $20 \cdot 10^7$ (статистически значимая разница ($p \leq 0,001$)).

Заключение. На основании полученных результатов можно констатировать как разнообразие видового состава, так и потенциально полезных признаков и их комбинаций у выделенных штаммов микроорганизмов. Лабораторные опыты с пшеницей показали, что микроорганизмы Hz-7 (*Bacillus mycoides*), Hz-11 (*Pseudomonas sp.*), Hz-19 (*Pseudomonas sp.*), Hz-21 (*Streptomyces sp.*), Hz-35-2 (*Mycolicibacterium sp.*), Hz-48 (*Phyllobacterium sp.*), Hz-68-2 (*Pantoea Sp.*) способны оказывать положительное воздействие на неспецифичное для них растение-хозяина как стимулируя непосредственно рост так и обеспечивать биодоступность важных для растений питательных веществ. Наиболее перспективными для дальнейшего изучения с целью их использования в составе биопрепаратов для сельского хозяйства оказались штаммы рода *Pseudomonas* (Hz-19 и Hz-11).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-26-00204.

Литература

- Anand K., Kumari B., Mallick M. A. Phosphate solubilizing microbes: an effective and alternative approach as biofertilizers // *Pharm Pharm Sci*. 2016. Vol. 8. P. 37–40.
- Jha C. K., Saraf M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review // *Journal of Agricultural Research and Development*. 2015. Vol. 5, N 2. P. 108–119.
- Kaushal M. Climatic Resilient Agriculture for Root, Tuber, and Banana Crops using Plant Growth-Promoting Microbes // *Climate Change and Agricultural Ecosystems*. Woodhead Publishing. 2019. P. 307–329.
- Mantelin S., Touraine B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake // *Journal of experimental Botany*. 2004. Vol. 55, N 394. P. 27–34.
- Mohammadipanah F., Wink J. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity // *Frontiers in microbiology*. 2016. Vol. 6. Art. 1541.
- The importance of phytohormones and microbes in biofertilizers / W. S. Wong, S. N. Tan, L. Ge [et al.] // *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. 2015. P. 105–158.

РОЛЬ РИЗОСФЕРНЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ

А. Р. Гальперина, А. Ш. Бареева, О. Б. Сопрунова

Астраханский государственный технический университет
Астрахань, alina_r_s@rambler.ru

Засоление почв, т. е. накопление в ней хлоридных, сульфатных и карбонатных солей более 0,25 %, является одной из глобальных проблем человечества. Для использования засоленных почв в растениеводстве действуют различные методы обессоливания почв и защиты растений, в том числе и применение PGPR-бактерий, особой группы неродственных ризосферных бактерий, способствующих усилению роста и развития растений [Plangumaran, Smith, 2017; Mechanisms involved ... , 2024].

В условиях лабораторных экспериментов оценивали роль ризосферных энтеробактерий в повышении устойчивости растений к осмотическому стрессу на примере горчицы белой (*Sinapis alba*). Определяли влияние ризосферных энтеробактерий на: прорастание семян горчицы белой (*Sinapis alba*) в опыте *in vitro* и на рост и развитие растений горчицы белой (*Sinapis alba*) в микровегетационном опыте в условиях осмотического стресса.

В экспериментальных исследованиях использовали 6 штаммов ризосферных энтеробактерий, выделенных из прикорневой зоны культурных и дикорастущих растений аридных экосистема Астраханской области [Изучение способности ... , 2023] и определенных как представители рода *Enterobacter*. Осмотический стресс семенам и растениям создавали путем внесения растворов хлорида натрия концентрацией 0,2%, 0,4 %, 0,6 %. В опыте *in vitro* семена, предварительно простерилизованные, замачивали в водных суспензиях штаммов микроорганизмов и помещались в солевые растворы. В микровегетационном опыте семена обрабатывали суспензией микроорганизмов дважды – замачивали перед посевом и опрыскивали на стадии 1–2 настоящего листа. Осмотический стресс создавали поливом соляными растворами взошедших растений.

В результате экспериментальных исследований выявлено, что в условиях солёности 0,2 % высокая всхожесть ($\geq 80\%$) наблюдается при действии 4 штаммов; при солёности 0,4 % – 4 штаммов; при 0,6 % – 2 штаммов. При этом отмечено, что всхожесть необработанных суспензией семян снижается с увеличением солёности от 0,2 до 0,6 % и составляет 72, 50 и 42 % соответственно. Исследование морфометрических параметров проростков выявило стимулирующий эффект на развитие стебля у 5 штаммов при солёности 0,2 %; у 3 штаммов – при 0,4 % и 1 штамма при 0,6 %. Развитие корня активно стимулируется 5 штаммами при солёности 0,2 %; 2 штаммами – при 0,4 % и всеми штаммами – при 0,6 %. Таким образом, исследуемые штаммы в условиях повышения солёности способны стимулировать как всхожесть семян, так и последующее развитие проростков.

В микровегетационном опыте использовали 2 штамма, способствующие высокой всхожести ($\geq 80\%$) и стимулирующие развитие стебля и корня до 110 и 50 % соответственно при всех вариантах солёности. Контролем служили растения, развивающиеся без воздействия осмотического стресса и исследуемых микроорганизмов.

Исследования показали, что оба штамма стимулируют только развитие корня во всех вариантах солёности, в то время как развитие стебля ниже, чем в контроле на 15–50 %. Масса проростков также была снижена по сравнению с контролем на 30–50 %.

Таким образом, в ходе исследований отмечено, что в условиях повышенной солёности до 0,6 % ризосферные энтеробактерии способны стимулировать прорастание семян и развитие проростков горчицы белой

(*Sinapis alba*). В условиях микровегетационного опыта стимулирующее действие штаммов микроорганизмов наблюдалось только на развитие корней растений горчицы белой (*Sinapis alba*). Исследуемые штаммы микроорганизмы способны бороться с негативным действием солевого стресса на семена и растения. Для получения данных по возможности применения исследуемых штаммов в агробиотехнологиях планируется проведение дальнейших экспериментальных исследований в полевых условиях.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00227 «Генетическая паспортизация ризосферных микроорганизмов аридных экосистем с биотехнологически значимыми свойствами»

Литература

Изучение способности ризосферных микроорганизмов к продукции ИУК и влияния на рост растений / Д. М. Юсупова, А. Ш. Бареева, А. Р. Гальперина, О. Б. Сопрунова // Инновации и продовольственная безопасность. 2023. № 3. С. 83–90. DOI: 10.31677/2311–0651–2023–41–3-83–90

Ilangumaran G., Smith D. L. Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Amelioration of Salinity Stress: A Systems Biology Perspective // Frontiers in Plant Sciences. 2017. Vol. 8. P. 1–14. DOI: 10.3389/fpls.2017.01768

Mechanisms involved in plant growth promotion by *Enterococcus cloace* DJ under salinity-alkalinity stress / Y. Fan, H. Wang, Z. Zhang [et al.] // Chemical and Biologycal Technologies in Agriculture. 2024. Vol. 11, N 12. P. 1–12. DOI: 10.1186/s40538-024-00537-5

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПЕСТИЦИДОВ НА СТРУКТУРУ КЛУБЕНЬКОВ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM L.*)

А. П. Горшков, П. Г. Кусакин, А. В. Цыганова, В. Е. Цыганов

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, a.gorshkov@arriam.ru

Для защиты растений в сельскохозяйственном производстве широко используются различные пестициды. Известно, что пестициды могут оказывать негативное влияние на бобово-ризобиальный симбиоз. Целью данной работы являлся сравнительный анализ влияния различных пестицидов на развитие клубеньков гороха сорта Frisson. В ходе работы использовались пестициды фирмы Щелково Агрохим: фунгициды (Титул Дуо и Винтаж), гербициды (Спрут Экстра и Форвард), инсектициды (Имидор Про и Фаскорд). Обработка растений, выращенных в горшках с вермикулитом, производилась в различных концентрациях: рекомендованной производителем (для всех пестицидов), двухкратной, пятикратной и десятикратной. Опрыскивание Титул Дуо, Винтаж и Форвардом проводилось на 10-й и 20-й дни после инокуляции штаммом ризобий *Rhizobium legumi-*

nosarum bv. *viciae* 3841, Спрутом Экстра за день, во время и на следующий день после инокуляции, Фаскорд на 10-й день после инокуляции; Имидор Про использовался для протравливания семян. Растения гороха, обработанные пестицидами, в концентрации рекомендованной производителем, не проявляли видимых признаков угнетения роста и клубенькообразования. За исключением варианта с обработкой Спрутом Экстра за день до инокуляции, где рост растения ингибировался.

Несмотря на отсутствие видимых эффектов пестицидов в рекомендуемых производителем концентрациях, при электронно-микроскопическом анализе был выявлен ряд изменений ультраструктуры клеток азотфиксирующих клубеньков (таблица). Самые распространенные аномалии при обработке пестицидами в рекомендованных концентрациях: накопление поли- β -гидроксибутирата в бактероидах, изменения перибактероидной мембраны, искривление клеточной стенки, появление включений в вакуолях. Обработка фунгицидами вызвала уникальные изменения в инфекционных нитях. Происходило снижение электронной плотности, образование выростов в цитоплазму, набухание и утолщение стенки. Конденсация хроматина в ядрах наблюдалась после обработки гербицидами и инсектицидом Фаскорд. Применение Имидора Про вызвало уникальные изменения в ультраструктуре инфекционных капель. Снижалась электронная плотность их матрикса, его количество чрезмерно увеличивалось. При повышенных концентрациях пестицидов выявленные аномалии встречались чаще или были выражены сильнее.

Фунгициды Винтаж и Титул Дуо, помимо изменения ультраструктуры, негативно влияли на состав клеточных стенок, приводя к снижению активности синтеза целлюлозных микрофибрилл и увеличению количества матричных полисахаридов клеточных стенок, в основном пектинов. Полученные результаты хорошо согласуются с данными транскриптомного анализа, который выявил повышение уровня экспрессии генов, контролирующих модификацию клеточной стенки и защитные реакции. Транскриптомный анализ выявил также и повышение экспрессии ряда гистоновых генов в клубеньках после обработки гербицидом Спрут Экстра. А транскриптомный анализ клубеньков растений, обработанных инсектицидом Имидором Про, показал, что увеличение размера инфекционной капли, вероятно, связано с усилением экспрессии генов арабиногалактановых белков.

Таким образом, показано, что пестициды в рекомендуемой концентрации практически не влияют на растения гороха. Однако морфология симбиотических клубеньков претерпевает изменения при обработке пестицидами уже в рекомендуемых концентрациях.

Таблица

Общие и специфические цитологические маркеры проявления влияния различных пестицидов

Пестицид	Аномалии в клеточных структурах					
	Клеточная стенка	Симбиосомы	Включения в вакуоли	Инфекционная нить	Инфекционные капли	Ядро
Фунициды Титул Дуо и Внштаж	искривление, истончение, набухание, изменение электронной плотности	накопление поли-β-гидроксibuтирата в бактероидах, изменения перибактероидной мембраны, слияние симбиосом, дегенерация симбиосом	мультивезикулярные тельца, протеиновые комплексы	снижение электронной плотности, выросты в цитоплазму, набухание и утолщение	нет	нет
Гербицид Форвард	искривление, истончение, набухание, изменение электронной плотности	накопление поли-β-гидроксibuтирата в бактероидах, изменения перибактероидной мембраны	мультивезикулярные тельца, протеиновые комплексы, включения фенольной природы	нет	нет	конденсация хроматина
Гербицид Спрут Экстра	искривление, утолщение, набухание, изменение электронной плотности	накопление поли-β-гидроксibuтирата в бактероидах, изменения перибактероидной мембраны, неравномерная плотность матрикса, превращение в литические компартменты	мультивезикулярные тельца, протеиновые комплексы, включения фенольной природы	нет	нет	конденсация хроматина
Инсектицид Имидор Про	искривление, утолщение, истончение, набухание, изменение электронной плотности	накопление поли-β-гидроксibuтирата в бактероидах, изменения перибактероидной мембраны	протеиновые комплексы, включения фенольной природы	нет	набухание, изменение электронной плотности, фибриллярный матрикс	нет
Инсектицид Фаскорд	искривление, утолщение, истончение, набухание, изменение электронной плотности	накопление поли-β-гидроксibuтирата в бактероидах, изменения перибактероидной мембраны	протеиновые комплексы, включения фенольной природы	нет	нет	конденсация хроматина

Работа поддержана Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2022-320 от 20 апреля 2022 г. грант НЦМУ «Агротехнологии будущего»).

МИКРООРГАНИЗМЫ ЦИКЛА АЗОТА В РИЗОСФЕРЕ РАСТЕНИЯ-ФИТОРЕМЕДИАНТА *HELIANTHUS ANNUUS* L. В УСЛОВИЯХ НЕФТЯНОГО СТРЕССА И БИОРЕМЕДИАЦИИ

А. С. Григориади, А. Р. Хамидуллин, Р. Г. Фархутдинов

Уфимский университет науки и технологий, Уфа, nysha111@yandex.ru

Нефтяное загрязнение является распространенной проблемой, которая приводит к изъятию часть земель из хозяйственного оборота. В загрязненной почве так же отмечается возрастание отношения C:N [Фархутдинов, 2010], что приводит к ухудшению азотного режима [Назарюк, Калимуллина, 2020]. Для полного процесса восстановления почвы помимо основных мероприятий, направленных на деградацию нефтяных углеводородов требуется заключительный этап – восстановление минерального баланса почвы, азотного баланса, в частности, так как значимость этого элемента для нормального функционирования почвы очень высока. Доступный азот образуется в почве благодаря деятельности микроорганизмов [Осипов, 2016]. Использование растений-фиторедемптантов стимулирует рост микроорганизмов, наблюдается так называемый ризосферный эффект. Микроорганизмы прикорневой зоны обладают высокой активностью, представлены разными эколого-физиологическими группами и могут участвовать в деградации нефтяных углеводородов [Микроорганизмы в ликвидации ... , 2019, Реакция микробного сообщества ... , 2023]. С другой стороны, разветвленная корневая система улучшает газозвудушный режим почвы, тем самым улучшается обогащение почвы азотом благодаря поступлению большего количества азота с атмосферным воздухом, и поступлению биологически активных веществ, выделяемых самой корневой системой. Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка микробиологической активности прикорневой зон подсолнечника однолетнего, используемого в качестве фиторедемптанта, под влиянием нефтяного загрязнения и использования микробных препаратов.

Для постановки опыта использовали чернозем выщелоченный, загрязненный товарной нефтью в концентрации 4 %. Для обработки почвы использовались микробные препараты «Ленойл», в состав которого входят бактерии *Pseudomonas turukhanskensis* ИБ 1.1 (титр не менее $1 \cdot 10^8$ КОЕ/г) в качестве активного агента деструкции нефтяных углеводородов использовали и препарат «Азолен», созданный на основе бактерий *Azotobacter vinelandii* ИБ (титр $4-8 \cdot 10^9$ КОЕ/мл), представляет собой биоудобрение, обогащающее почву биогенным азотом, обладает фунгицидным и ростостимулирующим действием. Сначала проводили обработку почвы «Ленойлом», через 30 сут. проводили посадку растений подсолнечника однолетнего (*Helianthus annuus* L.) сорт Бомбардир и вносили «Азолен». Далее вегетационные сосуды помещали на световую площадку при 12-часовом световом дне при температуре 22–25 °С при

постоянном поливе. Отбор проб производили через 30 сут. В качестве контроля использовали почву из ризосферы растения, выращенных на незагрязненной почве. Численность микроорганизмов определяли на твердых (мясо-пептонный агар, крахмал-аммиачный агар, Эшби) и жидких (Гильтая, Виноградского) питательных средах.

Численность аэробных аммонификаторов увеличилась под влиянием нефтяного загрязнения в 6 раз. Достоверных отличий при внесении препаратов не наблюдалось. Активация этой группы бактерий объясняется послаблением дополнительного источника органических соединений. На количество азотофиксирующих растений нефтяной стресс и обработка микробными препаратами не оказала достоверного негативного влияния, что является положительным признаком, так как, предположительно, будет сохраняться интенсивность фиксации азота данной группой бактерий.

Чувствительными к нефтяному стрессу оказались нитрифицирующие бактерии и микроорганизмы, использующие минеральные формы азота. При внесении загрязнителя численность первой группы микроорганизмов уменьшилась в 3 раза по сравнению с пробами контроля. Внесение препаратов «Ленойл» и «Азолен» не привело к увеличению нитрификаторов, однако стимулировало в 3 раза развитие второй группы чувствительных микроорганизмов.

Численность денитрифицирующих микроорганизмов в загрязненных пробах повысилась в 2,34 раза. При этом использование комбинации био-препаратов существенно стимулировало развитие этой группы организмов данной группы. Отмечено увеличение показателя в 10 раз по сравнению с загрязненными пробами. Повышение численности денитрифицирующих микроорганизмов с внесением нефтяного загрязнения в чернозем выщелоченный, объясняется тем, что увеличение количества углекислоты в почве стимулирует рост данной группы микроорганизмов.

Таблица

Численность некоторых эколого-физиологических групп микроорганизмов в ризосфере растений в условиях загрязнения и рекультивации

	Контроль	Загрязнение	«Ленойл» + «Азолен»
Аэробные аммонифицирующие бактерии ($n \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы)	3,19±0,22	19,9±0,99	17,5±1,01
Азотофиксирующие бактерии ($n \cdot 10^4$ КОЕ/г почвы)	1,19±0,06	10,2±0,61	12,15±0,93
Нитрифицирующие бактерии ($n \cdot 10^4$ КОЕ/г почвы)	4,16±0,16	1,13±0,09	1,3±0,09
Денитрифицирующие бактерии ($n \cdot 10^4$ КОЕ/г почвы)	1,52±0,10	3,57±0,21	37,9±2,5
Бактерии, усваивающие минеральные формы азота ($n \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы)	3,9±0,23	2,28±0,11	6,28±0,50

Таким образом, в ризосфере подсолнечника сохранялась численность азотфиксаторов, увеличивалось количество аммонификаторов во всех вариантах опыта. Обработка биопрепаратами стимулировало развитие микроорганизмов, использующих минеральные формы азота и денитрификаторов. Наиболее сильно негативное влияние из разных эколого-физиологических групп микроорганизмов, участвующих в цикле азота, нефть оказала на нитрифицирующие бактерии. Можно сделать вывод на основе выявления микробиологической активности почвы, что использование растений-фиторемедиантов благоприятно сказывается на состоянии почвы в отношении сохранения баланса азота.

Литература

Микроорганизмы в ликвидации последствий нефтяного загрязнения (обзор) / Т. Ю. Коршунова, С. П. Четвериков, М. Д. Бакаева [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55, № 4. С. 338–349.

Назарюк В. М., Калимуллина Ф. Р. Роль удобрений в азотном питании растений при загрязнении почвы нефтью // Агрохимия. 2020. № 4. С. 76–84.

Осипов А. И. Биологический круговорот азота атмосферы // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. 2016. № 42. С. 97–103.

Реакция микробного сообщества ризосферы растений-фиторемедиантов на нефтяное загрязнение и применение биопрепаратов / А. С. Григориади, Н. В. Зобкова, Ю. М. Сотникова [et al.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13, № 4 (47). С. 523–531.

Фахрутдинов А. И. Динамика баланса углерода и азота естественных и нарушенных почв ХМАО-Югры // Известия Самарского научного центра РАН. 2010. № 1 (4). С. 1069–1074.

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛА РИЗОСФЕРНОГО ИЗОЛЯТА В КАЧЕСТВЕ ФИТОПРОТЕКТОРНОГО ШТАММА

**Ю. В. Данилова, Ю. А. Васильева, А. И. Гильмутдинова,
Д. И. Хасанов, Н. Л. Рудакова, М. Р. Шарипова**

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, Danilova146@mail.ru

Ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR), основными представителями которых являются *Bacillus*, активно исследуются в качестве биоудобрений или пестицидов в сельском хозяйстве для ограничения негативного воздействия чрезмерного использования химических удобрений на экологическую среду [Hashem, Tabassum, Abd Allah, 2019]. Таким образом, одним из экологически привлекательных путей повышения урожайности и питательной ценности сельскохозяйственных растений, является биологический контроль с использованием биопрепаратов на основе внесения симбиотических бактерий.

B. pumilus продуцируют разнообразные метаболиты, которые находят широкое применение в сельском хозяйстве в качестве биологически активных соединений [Classification and multifaceted ... , 2021]. *B. pumilus* также были обнаружены в тканях здоровых растений, обладающих свой-

ствами стимулировать рост растений за счет усиления поглощения питательных веществ, фиксации азота, взаимодействия с симбиотическими микроорганизмами и производства противомикробных агентов против патогенных бактерий и грибов, а также за счет снижения токсичности металлов [Yuan, Gao, 2015].

В настоящей работе объектом исследования являлся ризосферный изолят *B. pumilus* JN с инактивированным геном фактора споруляции *sigF*. Предполагается, что нарушение ранней стадии развития предспор путем редукции генома приведет к изменению экспрессии других генов, отвечающих за колонизацию, антагонистическую активность, способность синтезировать растительные гормоны и формировать биопленки.

Целью данного исследования являлась сравнительная характеристика физиологических особенностей нативного и мутантного штаммов *B. pumilus* JN для оценки потенциала данного изолята в качестве фитопротекторного штамма.

Мутантный штамм *B. pumilus* JN $\Delta sigF$ с инактивированным геном фактора споруляции *sigF* был получен с помощью системы редактирования геномов CRISPR-Cas9 [Characterization of *Bacillus* ... , 2023].

Оценку уровня формирования биопленок осуществляли по методике O'Toole окрашиванием 1 % кристаллвиолетом с последующей детекцией на спектрофотометре при длине волны 570 нм [O'Toole, 2011]. У обоих штаммов максимум формирования биопленок был достигнут на 48-й ч, при этом плотность биопленки *B. pumilus* JN превышала плотность редактированного штамма *B. pumilus* JN $\Delta sigF$ на 42 %. С этими результатами коррелировала и колониеобразующая способность исследуемых штаммов.

С помощью метода химической трансформации были получены флуоресцентно меченые штаммы *B. pumilus* JN, несущие репортерную систему на основе гибридного вектора pJET::BC16, содержащего ген флуоресцентного белка superfolder GFP. Исследование взаимодействия флуоресцентно меченых бактериальных штаммов с корнями растений проводили путем их совместного культивирования, с последующей детекцией расположения бактериальных клеток относительно структур корня методом конфокальной лазерной микроскопии. Почвенный изолят *B. pumilus* JN продемонстрировал способность к активному проникновению внутрь корней картофеля и *Arabidopsis thaliana*, а также с высокой плотностью адгезировал на поверхности корней. Аспорогенный мутант *B. pumilus* JN $\Delta sigF$ значительно снизил свою способность к поверхностной адгезии, сохранив способность к проникновению.

Антагонистическую активность бактерий исследовали с помощью метода блоков против фитопатогенных микромицетов *Alternaria* sp. и *Fusarium oxysporum* DR57 [Егоров, 1983]. Показали, что бактерии *B. pumilus* JN ингибируют рост *F. oxysporum* DR57 на 45 %. Исследуемые штаммы анализировали на антимикробную активность по отношению к фитопатогенным бактериям *Pectobacterium carotovorum* PCA 2a и

Xanthomonas vesicatoria [Егоров, 1983]. Зона ингибирования роста фитопатогена *X. vesicatoria* наблюдалась для обоих штаммов *B. pumilus* на 48 ч роста. Достоверно значимой разницы между штаммами дикого типа и их мутантами по отношению к фитопатогену *X. vesicatoria* не наблюдалось. В отношении фитопатогена *P. carotovorum* исследуемые штаммы не проявляли антагонистической активности.

Определение способности исследуемых штаммов к синтезу индол-3-уксусной кислоты (ИУК) проводили по методу [Genetic and metabolomic ... , 2020]. Исследуемые штаммы бацилл обладали способностью синтезировать ИУК в высоких концентрациях – 140–150 мкМ. Удаление гена *sigF*, отвечающего за спорообразование, не повлияло на способность штамма *B. pumilus* JN синтезировать ИУК.

Сравнительный анализ фенотипов исследуемых бактерий указывает, что нативный штамм формировал более плотные биопленки и проявил высокую адгезию на поверхности корней растений, тогда как аспорогенная мутация негативно отразилась на исследуемых способностях, что свидетельствует о регуляторной взаимосвязи этих фенотипов. Оба штамма обладали такими важными характеристиками для взаимодействия с растениями и проявления биоконтрольных свойств, как антагонистическая активность и синтез фитогормонов.

Таким образом, ризосферный изолят *B. pumilus* JN проявил себя как потенциальный фитопротекторный штамм.

Исследование выполнено за счет средств гранта РФФ № 22-16-00138.

Литература

Егоров Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Изд-во МГУ. 1983. С. 134.

Characterization of *Bacillus pumilus* strains with targeted gene editing for antimicrobial peptides and sporulation factor / I. V. Danilova, I. A. Vasileva, A. I. Gilmudnova [et al.] // Microorganisms. 2023. Vol. 11, N 6. Art. 1508.

Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: a comprehensive review / S. Iqbal, F. Begum, A. A. Rabaan [et al.] // Molecules. 2023. Vol. 28, N 3. Art. 927.

Genetic and metabolomic perspective on the production of Indole-3-Acetic acid by *Pantoea agglomerans* and use of their metabolites as biostimulants in plant nurseries / F. Luziatelli, A. G. Ficca, P. Bonini [et al.] // Front. Microbiol. 2020. Vol. 11. Art. 1475. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01475

Hashem A., Tabassum B., Abd Allah E. F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress // Saudi Journal of Biological Sciences. 2019. Vol. 26. P. 1291–1297.

O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay // Vis Exp. 2011. Vol. 47. Art. 2437. DOI: 10.3791/2437.

Yuan Y., Gao M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy // Scientific reports. 2015. Vol. 5, N 1. P. 1–9.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ПРОДУКТА АЗОТНОКИСЛОЙ ОБРАБОТКИ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО

А. А. Зенкова

Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН
Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский
государственный технический университет им. И. И. Ползунова»
Бийск info@bti.secna.ru

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – это природный биополимер, синтезируемый микроорганизмами. Данный материал характеризуется высокой чистотой, биосовместимостью (не токсичен для человека), инертностью и биоразлагаемостью [Bacterial nanocellulose ... , 2021]. БНЦ применяется в различных отраслях промышленности. Примером технического использования является получение нитратов БНЦ [Зависимость массовой ... , 2023].

Целью работы являлось исследование процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на гидролизной среде из продукта азотнокислой обработки мискантуса гигантского сорта Камис.

Мискантус гигантский сорта Камис предоставлен ООО «Мастер Брэнд», г. Москва. Одностадийную обработку мискантуса проводили раствором 4%-ной азотной кислоты при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 6 ч, в результате был получен продукт азотной обработки (ПАО). Полученный продукт отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции, подробнее в работе [Scale-up of bio-synthesis ... , 2021].

Химический состав нативного мискантуса без обработки и ПАО мискантуса представлены в таблице, методика определения химического состава сырья согласно [Оболенская, Ельницкая, Леонович, 1999].

Таблица

Химический состав сырья

Сырьё	Массовая доля, %				
	целлюлозы по Кюршнеру	пентозанов	лигнина	золы	ЖВФ
Мискантус	50,16	21,16	19,46	1,63	0,48
ПАО мискантуса	93,72	6,01	2,17	1,00	0,15

Примечание: ЖВФ – жировосковая фракция

Из данных таблицы можно сделать вывод, что азотнокислая обработка оказалась весьма эффективной для мискантуса гигантского, она позволила повысить содержание целлюлозы в 1,9 раз, а также снизить содержание пентозанов в 3,5 раз, и снизить содержание лигнина в 9 раз.

Ферментативный гидролиз нативного мискантуса и ПАО из него проводили при помощи коммерческих ферментативных препаратов «Уль-

траффо-Коре» и «Целлюлюкс-А» согласно [Properties and hydrolysis ... , 2022], начальная концентрация субстрата составила 30 г/л. Концентрация редуцирующих веществ (РВ) после 72 ч гидролиза нативного мискантуса составила 0,6 г/л, концентрация РВ после гидролиза ПАО из мискантуса составила 20,3 г/л, таким образом выход РВ для нативного мискантуса составил 1,8 %, а для ПАО – 61,5 %. Азотнокислая обработка позволила повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в 34 раза, это выдающийся результат. Согласно [Fuel ethanol production ... , 2016] предобработка считается эффективной, если удается повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в 5–7 раз.

Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы проводили на среде ферментативного гидролизата полученного на основе ПАО из мискантуса согласно [Scale-up of biosynthesis ... , 2021] при помощи симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, контролем послужила полусинтетическая питательная среда, продолжительность биосинтеза составила 10 сут.

Выход бактериальной наноцеллюлозы на питательной среде из ПАО составил 11,7 %, степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы на среде ПАО – 1810; на полусинтетической питательной среде выход составил 11,8 %, степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы – 3000.

Таким образом, установлено, что выход бактериальной наноцеллюлозы, полученной из продукта азотнокислой обработки мискантуса гигантского идентичен выходу бактериальной наноцеллюлозы на синтетической питательной среде, что доказывает перспективность использования альтернативного целлюлозосодержащего сырья для получения бактериальной наноцеллюлозы.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/> при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Литература

- Зависимость массовой доли азота в нитратах бактериальной наноцеллюлозы от содержания воды в нитрующей смеси / П. А. Горбатова, Ю. А. Гисматулина, А. А. Корчагина [и др.] // Южно-Сибирский научный вестник. 2023. № 5 (51). С. 75–81. DOI: 10.25699/SSSB.2023.51.5.009
- Оболенская А. В., Ельницкая З. П., Леонович А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы : учеб. пособие. М. : Экология, 1991. 319 с.
- Bacterial nanocellulose: engineering, production, and applications / R. Reshmy [et al.] // Bio-engineered. 2021. Vol. 12, N 2. P. 11463–11483. DOI: 10.1080/21655979.2021.2009753
- Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches / H. Zayed, J. N. Sahu, A. N. Boyce, G. Faruq // Renewable & Sustainable Energy Reviews. 2016. Vol. 66. P. 751–774. DOI: 10.1016/j.rser.2016.08.038
- Properties and hydrolysis behavior of celluloses of different origin / E. I. Kashcheyeva, Yu. A. Gismatulina, G. F. Mironova [et al.] // Polymers. 2022. Vol. 14. Art. 3899. DOI: 10.3390/polym14183899
- Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose / N. A. Shavyrkina, V. V. Budaeva, E. A. Skiba [et al.] // Polymers. 2021. Vol. 13, N 12. Art. 1920. DOI: 10.3390/polym13121920
- Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass / E. A. Skiba, E. K. Gladysheva, D. S. Golubev [et al.] // Carbohydrate Polymers. 2021. Vol. 252. Art. 117178. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117178

АГРОБИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОЛИТНОГО ШТАММА *NOCARDIA MANGYAENSIS* NH1

Т. М. Ивойлова, Е. Н. Деханова, А. А. Елистратова, Т. В. Ширшикова,
Л. Е. Матросова, М. Р. Шарипова, И. В. Хиляс

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, Tatyana.Ivoylova@outlook.com

По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, на 2020 г. в России деградировано 2,2 млн км² земель, что составляет около 13 % от общей площади страны. Методы устойчивого сельского хозяйства и биологизации являются наиболее перспективными для решения проблемы деградации почв. Использование бактериальных удобрений и биопестицидов представляет собой экологически устойчивый подход к сельскому хозяйству, который может существенно улучшить качество почвы и рост растений [Положение дел в области ... , 2018].

Использование эндолитных бактерий для повышения качества деградированных почв имеет ряд преимуществ. Эндолитные бактерии приспособлены к экстремальным условиям, способствуют выщелачиванию и растворению минералов, высвобождая необходимые микро- и макроэлементы, делая их доступными для растений, а также способствуют образованию почвенной структуры, улучшая аэрацию и влагоемкость. Эндолитные микроорганизмы для получения необходимых веществ из окружающей среды продуцируют разнообразные вторичные экстраклеточные метаболиты (сидерофоры, биосурфактанты, фитогормоны, полипептиды и др.), которые возможно применять в сельском хозяйстве для улучшения минерального питания растений, защиты от фитопатогенов и других неблагоприятных факторов.

Таким образом, цель данной работы - оценка агробιοтехнологического потенциала штамма *N. mangyaensis* NH1. Ранее нами была показана способность штамма *N. mangyaensis* NH1 продуцировать сидерофоры, биосурфактанты и фитогормоны. Метаболиты штамма NH1 обладали фунгицидной активностью в отношении фитопатогенных микромицетов (*Fusarium oxisporum* PR 57, *Rhizoctonia solani* MFP 936011, *Alternaria sp.* и *Colletotrichum coccodes* MF 16-014), вызывающих заболевания картофеля и пшеницы [Genomic insights and ... , 2024].

В настоящей работе проводили предпосевную обработку семян мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта ЭКАДА 282 штаммом *N. mangyaensis* NH1 ($5,6 \cdot 10^8 \pm 2,01 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) и достоверно показали увеличение длины и сухого веса проростков пшеницы.

Для создания биопрепарата на основе штамма *N. mangyaensis* NH1 с целью обработки семян растений необходимо оптимизировать способ его хранения. Для этой задачи оптимизировали условия длительного хранения штамма. Показали, что штамм NH1 сохраняет жизнеспособность

свыше 12 мес. в форме суспензии и на скошенной агаризованной среде при температуре +4 °С.

Для дальнейшего использования штамма *N. mangyaensis* NH1 в качестве биопрепарата необходимо оценить его безвредность (вирулентность, токсичность и токсигенность). Для исследования вирулентности и безвредности штамм *N. mangyaensis* NH1 выращивали на агаризованной среде Луриа – Бертани в течение 5 дней при 30 °С и готовили бактериальные суспензии с концентрацией клеток $1 \cdot 10^{10}$ и $1 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл. Для исследования токсичности физический раствор со штаммом *N. mangyaensis* NH1 ($1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) инактивировали прогреванием при 100 °С, 1 ч. Полученные суспензии вводили белым беспородным мышам внутрибрюшинно и перорально. Для изучения токсигенности штамм культивировали в минимальной среде М9 при 30 °С, 250 об/мин в течение 7 сут. Культуральную жидкость фильтровали и вводили мышам внутрибрюшинно. В течение 14 дней после инъекций и перорального введения все исследуемые мыши оставались активными, изменения аппетита, физиологических отравлений и изменения поведенческих реакций не наблюдалось. Полученные данные свидетельствуют о безопасности штамма и его метаболитов.

Таким образом, в ходе данной работы оценили агробиотехнологический потенциал эндолитного штамма *N. mangyaensis* NH1, включающий предпосевную обработку семян пшеницы, а также оптимизировали условия длительного хранения штамма и провели тестирование безвредности штамма. Внедрение биопрепарата на основе штамма *N. mangyaensis* NH1 и его метаболитов может значительно улучшить устойчивость сельского хозяйства и способствовать более эффективному использованию природных ресурсов.

Работа выполнена при финансовой поддержке (за счет средств) гранта РФФ № 24-24-00473.

Работа выполнена на технической базе программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».

Литература

Положение дел в области продовольственной безопасности и питания в Европе и Центральной Азии / Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. Будапешт, 2018.

Genomic insights and anti-phytopathogenic potential of siderophore metabolome of endolithic *Nocardia mangyaensis* NH1 / I. V. Khilyas, M. I. Markelova, L. R. Valeeva [et al.] // Scientific Reports. 2024. Vol. 14. 5676

BACILLUS GINSENGIHUMI В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ КОМБИНИРОВАННОГО БИОУДОБРЕНИЯ

Д. Л. Иткина, М. С. Дроздова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, Laia9301@mail.ru

Фитопатогенные грибы отрицательно влияют на полевые культуры и представляют серьезную угрозу сельскому хозяйству. Они не только снижают урожайность сельскохозяйственных культур, но и ухудшают их качество и наносят разрушительный ущерб посевам, что приводит к внушительным экономическим потерям. Биологический контроль фитопатогенов с использованием ризобактерий, способствующих росту растений (PGPR), является экологически безопасной стратегией. Бактерии рода *Bacillus* являются наиболее распространенной группой бактерий в природе. Разработка экологически чистого подхода к борьбе с болезнями съедобных сельскохозяйственных культур очень важна для человека [Prevalence of Wheat ... , 2021].

Объектом исследования является бактериальный штамм *Bacillus ginsengihumi* M2.11 выделенные из почвы Республики Татарстан, который проявлял антимикробное действие по отношению к микромицетам-фитопатогенам рода *Fusarium* с максимальным ингибированием роста мицелия *Fusarium solani* [Иткина, Сулейманова, Шарипова, 2021].

Антагонистическую активность бактерий оценивали в отношении грибов корневых гнилей пшеницы, возбудителями которой являются микромицеты *Fusarium solani*. В качестве модельного растения была выбрана Пшеница сорта Злата (*Triticum aestivum*).

Для оценки *in vivo* влияния обработки штаммом *B. ginsengihumi* на рост и антагонизм против фитопатогенов *F. solani* на модельном растении – пшеницы сорта Злата проводилась стерилизация семян. Семена обработаны в растворе гипохлорита натрия (5 %) на 2 мин с последующим погружением на 30 с в 70 % этанол и последовательно многократно (5–6 раз) промыты стерильной дистиллированной водой для удаления химических веществ с поверхности семян. Опытную почву дважды увлажняли, и стерилизовали автоклавированием с интервалом 12 ч. Чистые пластиковые горшки (9×15 см) на три четверти заполнены стерильной почвой. Инокулят гриба *F. solani* с колониеобразующей единицей $1,25 \cdot 10^4$ КОЕ/г добавляли в горшки и тщательно перемешивали. Инокулированные горшки инкубировали в течение 10 дней для развития и закрепления грибкового инокулята в горшках с экспериментальной почвой [Rudresh, Shivaprakash, Prasa, 2005]. Обработка семян бактериями проведена путем суспендирования на 30 мин в соответствии с методикой [Singh, Satyanarayana, 2010]. Контрольные образцы, зараженные *F. solani* – 30 семян. Контрольные образцы, обработанные только *B. ginsengihumi* – 30 семян. Опытные

образцы, обработанные штаммом *B. ginsengihumi* против фитопатогенов *F. solani*–30 семян.

Оценка заболеваемости и роста растений. Всхожесть (%) регистрировали через 7 дней после посева. За растениями наблюдали появление симптомов болезни через 15, 30 и 45 дней после посева (DAS). Числовая оценка болезни присвоена следующим образом: 0 – здоровые семена; 1-коричневые поражения в области шейки/корня; 2 – пораженные стебли и листья; 3-задержка роста; 4-мертвые растения с полностью засохшими листьями. Средний показатель заболеваемости (MDR) и процент заболеваемости (PDI) проросших растений рассчитывали в соответствии с формулой по методике S. Kumar et al. (2009).

$$\text{MDR} = [(a * 0) + (b * 1) + (c * 2) + (d * 3) + (e * 4)] / (a + b + c + d + e),$$

где *a*, *b*, *c*, *d* и *e* – количество растений с рейтингом болезни 0, 1, 2, 3 и 4 соответственно.

$$\text{PDI} = \text{MDR} \cdot 100 \text{ \%}.$$

Оценивали всхожесть (%) семян на 7-й день после посева: контрольные образцы, зараженные *F. solani* имели всхожесть 60 %; контрольные образцы, обработанные только *B. ginsengihumi* имели всхожесть 90 %; опытные образцы, обработанные штаммом *B. ginsengihumi* против фитопатогенов *F. solani* имели всхожесть 76 %;

В ходе исследования было выявлено, что контрольные образцы, зараженные *F. solani*, без обработки штаммом *B. ginsengihumi* имели задержку роста (Числовая оценка болезни: 3) либо 4-мертвые растения с полностью засохшими листьями. Контрольные образцы, обработанные только *B. ginsengihumi* являлись здоровыми растениями, без признака увядания либо повреждения растений. Опытные образцы, обработанные штаммом *B. ginsengihumi* против фитопатогенов *F. solani* 34 % имели коричневые поражения в области шейки/корня и 66 % были здоровыми растениями, числовая оценка болезни присвоена 1 и 0, соответственно. В контрольных образцах, зараженных *F. solani* имели средний показатель заболеваемости (MDR) 3,4 и процент заболеваемости (PDI) 34 %. Контрольные образцы, обработанные только *B. ginsengihumi* имели средний показатель заболеваемости (MDR) 0,2 и процент заболеваемости (PDI) 20 %. Опытные образцы, обработанные штаммом *B. ginsengihumi* против фитопатогенов *F. solani* имели средний показатель заболеваемости (MDR) 0,54 и процент заболеваемости (PDI) 54 %.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что штамм *B. ginsengihumi* безопасен для растений, а при его использовании против *F. solani* способствует снижению заболевания фузариозной гнили корней и не дает погибнуть растению. Штамм *B. ginsengihumi* продемонстрировал способность ингибировать рост *F. solani* в системе *in vivo*.

Фунгициды эффективно борются с корневыми гнилями пшеницы, однако их нерациональное применение представляет серьезную угрозу

для окружающей среды. Наши результаты показывают, что антагонистические бактериальные штаммы могут быть идеальными кандидатами для биоконтроля фузариозной корневой гнили. Благодаря своей способности подавлять болезни они могут стать отличной заменой химикатам, например, фунгицидам, которые имеют серьезные последствия для здоровья людей и экосистем из-за их чрезмерного использования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-76-01069).

Литература

Иткина Д. Л., Сулейманова А. Д., Шарипова М. Р. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений // Микробиология. 2021. Т. 90, № 2. С. 204–214.

Prevalence of Wheat Associated *Bacillus* spp. and Their Bio-Control Efficacy Against Fusarium Root Rot / S. Mulk, A. Wahab, H. Yasmin [et al.] // Front Microbiol. 2021. Vol. 12. Art. 798619. DOI: 10.3389/fmicb.2021.798619.

Rudresh D. L., Shivaprakash M. K., Prasad R. D. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arretinum* L.) // Canadian Journal of Microbiology. 2005. Vol. 51, N 3. P. 217–222. DOI: 10.1139/w04-127

Singh B., Satyanarayana T. Plant growth promotion by an extracellular NAR-phytase of a thermophilic mold *Sporotrichum thermophile* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 160. P. 1267–1276.

ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА FАVАСЕАЕ ПРИ ПРАЙМИРОВАНИИ СЕМЯН

**И. М. Кайгородова, Е. Г. Козарь, И. А. Енгальчева,
В. А. Ушаков**

Федеральный научный центр овощеводства
ВНИИССОК, kaigorodova-i@mail.ru

Разработка эффективных экологически чистых приемов повышения продуктивности и стрессоустойчивости растений является одним из приоритетных направлений, предусмотренных государственной Стратегией научно-технологического развития Российской Федерации (от 28 февраля 2024 г. № 145), разработанной для перехода к высокопродуктивному и экологически чистому агрохозяйству, поиску и внедрению систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений и созданию безопасных и качественных продуктов питания. Такие системы включают использование природных веществ, которые признаны безвредными для человека и животных и быстро разлагаются в почве.

Вторичные метаболиты высших растений относятся к природным веществам с высокой биологической активностью их можно рассматри-

вать как чрезвычайно перспективные природные лекарственные средства, проявляющие высокую эффективность в подавляющем большинстве моделей тяжелых патологий растений, животных и человека. Широко изучается важная физиологическая роль этих соединений в процессах жизнедеятельности растений, в том числе и в патосистемах. Показано адаптивное значение этих соединений в защите растений от фитофагов в качестве антифидантов, репеллентов и даже инсектицидов, от микробной инфекции – фитоалексинов, антибиотиков или фитонцидов, от неблагоприятных абиотических условий – антиоксидантов, для привлечения опылителей и распространителей семян – аттрактантов и т. д. [Баширова, 2003]

В результате многолетних исследований биологической активности вторичных метаболитов высших растений (стероидные гликозиды, флавоноиды, иридоиды, сапонины, ирионидные и фураностаноловые гликозиды и др.), выделенных в индивидуальном или суммарном виде из представителей различных семейств, удалось установить, что они представляют большой интерес. Действие этих соединений, в первую очередь, направлено на активацию молекулярно-биологических и физиологических систем, интенсификацию общего и гормонального обмена растений, обеспечивающих защиту от патогенов и неблагоприятных воздействий абиотической природы, путем образования эндогенных веществ различной природы. Их использование перспективно и с экономической точки зрения из-за относительной доступности сырья и простоты получения [Регуляция устойчивости ... , 2004; Эффективность действия ... , 2020; Скрининг биологической ... , 2021; Новые биорегуляторы ... , 2014].

Овощные бобовые культуры, как и другие сельскохозяйственные культуры, подвержены влиянию различных стрессов, такими как неблагоприятные условия среды и поражение болезнями. Из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний в регионе на посевах гороха овощного и бобов овощных отмечены такие заболевания как фузариоз (*Fusarium spp.* Link), аскохитоз (*Ascochyta pinodes* Jones и *Ascochyta pisi* Libert.), антракноз (*Colletotrichum pisi* Pat.) и ржавчина (*Uromyces pisi* Schroet). Значительное распространение антракноза и ржавчины отмечается только в отдельные годы при возникновении благоприятных для патогенов условий, тогда как аскохитоз и фузариоз встречаются ежегодно. В благоприятные годы для развития *Botrytis fabae* Sard. отмечается эпифитотийное распространение шоколадной пятнистости на бобах овощных. Реже на посевах бобовых культур встречаются симптомы поражения белой гнилью. На посевах фасоли овощной кроме грибных болезней ежегодно отмечается распространение виروزов (обыкновенная мозаика – ВОМФ, и желтая мозаика – ВЖМФ) и бактериозов (бурая бактериальная пятнистость – *Xanthomonas phaseoli* E. F. Sm. Dowson и угловатая бактериальная пятнистость – *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Pph.). В связи с этим целью наших исследований было изучение влияния спектра фитопрепаратов на основе вторичных метаболитов некоторых видов расте-

ний на продуктивность и устойчивость к болезням растений различных сортов бобовых овощных культур в рамках международного сотрудничества с Институтом генетики, физиологии и защиты растений Республики Молдова. Исследования проводили на базе ФГБНУ ФНЦО в 2019–2023 гг. В работу были включены фитопрепараты на основе биологически активных соединений, выделенных из 13 видов шести семейств высших растений, различной природы и химического состава. Материалом исследований были сорта гороха овощного, фасоли овощной и бобов овощных селекции ФГБНУ ФНЦО. В результате серии лабораторных опытов была подобрана оптимальная концентрация (0,01 %) для обработки семян перед посевом методом смачивания с последующим подсушиванием (контроль – вода).

Многие испытанные фитопрепараты, оказывая иммуномодулирующее и ростостимулирующее действие, способствовали повышению устойчивости растений в полевых условиях к распространенным в регионе на бобовых культурах болезням. Однако разные культуры и сорта характеризовались специфичной реакцией и отзывчивостью на действие различных препаратов. По многолетним данным из всех изученных фитопрепаратов наиболее стабильные положительные результаты и наименее выраженной видо- и сортоспецифичностью действия отличились фитопрепараты Молдстим на основе фурастанолового гликозида капсикозида из семян *Capsicum annuum* и Вербаскозид, содержащий смесь иридоидов и флавоноидов, выделенных из растений *Verbascum densiflorum*.

Обработка семян этими фитопрепаратами приводила к повышению иммунного статуса под влиянием этих фитопрепаратов, что приводило к существенному снижению степени развития болезней. На горохе овощном: фузариоза – на 6–15 %, антракноза – 41–98 %, аскохитоза – 17–83 %; на фасоли овощной: фузариоза 27–100 %, вириозов – 23–60 %, бактериозов – 5–95 %; на бобах овощных: против аскохитоза и антракноза – более 20 %, вириозов – 8–50 %, шоколадной пятнистости – до 44 %. Это позволило растениям гороха овощного сформировать продуктивность зеленого горошка выше контроля на 12–22 % у сорта Корсар и на 12 % у сорта Барин; фасоли овощной – зеленых бобов (лопатка) выше контроля на 8 % у сорта Лика и на 32–49 % у сорта СиБемоль; бобов овощных – продуктивность семян была выше контроля на 76–94 % у сорта Велена и на 51–85 % у сорта Белорусские, при этом выход нестандартных семян (поврежденных болезнями, невыполненных) был на 20–29 % ниже контроля в зависимости от сорта и природы фитопрепарата. То есть природные биорегуляторы можно рассматривать как составную часть системы предпосевной подготовки семян с целью повышения устойчивости и продуктивности растений семейства Fabaceae. За счет фитогормональной активности и активации защитных свойств, они усиливают способность растительного организма противостоять биотическим стрессовым факторам и более полно реализовать продуктивный потенциал и получить овощную продукцию более высокого качества.

Литература

Баширова Р. М. Вторичные метаболиты растений : учеб. пособие. Уфа : Изд-во БашГУ, 2003. 187 с.

Новые биорегуляторы гликозидной природы для индуцирования болезнестойчивости зерновых культур / В. П. Шуканов, Н. В. Полякова, Л. А. Корытько [и др.] // Materialele conferinței științifice internaționale (Ediția a V-a) «Genetica, fiziologia și ameliorarea plantelor». Chișinău, 2014. N 1. P. 445–449.

Регуляция устойчивости фитопатосистем с помощью вторичных метаболитов растений / Н. Н. Балашова, А. А. Жученко [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2004. № 39. С. 3–16.

Скрининг биологической активности фитопрепаратов на основе вторичных метаболитов растений на культуре *Phaseolus vulgaris* / Е. Г. Козарь, И. А. Енгальцева, А. А. Антошкин [и др.] // Овощи России. 2021. № 5. С. 89–97.

Эффективность действия биорегуляторов из *Verbascum densiflorum* Bertol. на процессы развития овощных культур / А. Д. Боровская, Н. Е. Машенко, Р. А. Иванова, А. В. Гуманюк // Овощи России. 2020. № 5. С. 54–59. DOI: 10.18619/2072–9146–2020–5-54–596

ВЛИЯНИЕ РИБАВИРИНА НА МИКРОФЛОРУ ПОЧВЫ, ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РОСТ РАСТЕНИЙ

**К. И. Киенская, Д. А. Матвеева, С. К. Бобровницкий,
И. А. Буторова**

Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева
Москва, kienskaia.k.i@muctr.ru

Поиск новых эффективных препаратов для сельского хозяйства представляет собой актуальную задачу, поскольку, как и в случае лечения живых организмов, наблюдается привыкание бактерий и вирусов к уже известным лекарственным средствам. Решение данной задачи может осуществляться по двум направлениям – синтез новых эффективных соединений и расширение возможностей уже известных препаратов. Второй путь в некоторых случаях может быть более продуктивным, поскольку можно экономить время на различных испытаниях новых веществ [Стимулирующие рост ... , 2015]. В частности, было установлено, что широко известный противовирусный препарат рибавирин проявляет и антибактериальную активность по отношению к ряду бактерий, а также эффективен в борьбе с некоторыми грибковыми заболеваниями. Ряд положительных результатов был получен и при использовании рибавирина в сельском хозяйстве [Никонович, Берговина, Скорина, 2011].

В ранее проведенных исследованиях было установлено, что периодический полив фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) раствором рибавирина стимулировал всхожесть семян и дальнейший рост проростков [Не-антибиотики на основе ... , 2023]. Поэтому представляло интерес изучить влияние рибавирина на микрофлору почвы. Для этой цели была приготовлена 10 % -ая водная суспензия почвы. В опытный образец добавлен рибавирин в количестве 0,5 %. Образцы инкубировали при температуре 22 °С в стационарных условиях (без перемешивания и аэрации),

моделируя тем самым условия близкие к естественным условиям в природе. Через определенное время (1 неделя, 4 недели и 8 недель инкубации) в образцах определили общее количество бактериальной микрофлоры рассевом образцов на плотной питательной среде L-агар по методу Коха.

Таблица 1
Влияние рибавирина на содержание микроорганизмов в почвенной суспензии.

Образцы	Общее количество бактерий в суспензии, КОЕ/мл		
	через 1 нед.	через 4 нед.	через 8 нед.
Контроль	$2,0 \pm 0,32 \cdot 10^5$	$3,5 \pm 0,12 \cdot 10^6$	$< 10^5$
Опыт	$6,9 \pm 0,29 \cdot 10^6$	$1,0 \pm 0,41 \cdot 10^7$	$1,5 \pm 0,33 \cdot 10^7$

Как показали исследования, в опытных образцах с рибавирином, помимо увеличения общего количества бактерий отмечалось и изменение состава доминирующих морфотипов по сравнению с контролем. Известно, что многие виды почвенных бактерий синтезируют вещества, оказывающие положительное влияние на прорастание, всхожесть семян, корнеобразование, рост и питание растений (PGPR – *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) [Van Loon, 2007]. Из опытного образца почвенной суспензии с рибавирином были выделены 4 доминирующих морфотипа бактерий, отличающихся по культуральным признакам колоний и представляющие собой разные по размерам грамотрицательные палочки. Была исследована способность выделенных видов почвенных бактерий оказывать положительное влияние на прорастание семян и последующий рост смеси растений (сорго, пшеница, ячмень, вика, просо, овес и рожь). С этой целью выделенные бактерии вырастили на жидкой питательной среде и затем, полученной суспензией, разведенной в 10 раз, обрабатывали семена. Обнаружено, что во всех образцах отмечалось повышение общего прорастания смеси семян на 15–20 % по сравнению с контролем. При этом наибольшее стимулирующее действие рабочие растворы почвенных бактерий оказали на семена пшеницы и вики. Проросшие семена пшеницы были посажены в почву, и через 14 дней выращивания был определен общий вес растений (табл. 2).

Таблица 2
Влияние рабочего раствора суспензии почвенных бактерий на общее прорастание семян смеси трав и рост семян пшеницы.

Показатели / контроль	Образцы				
	Контроль 1	Образец бактерий № 1	Образец бактерий № 2	Образец бактерий № 3	Образец бактерий № 4
Общее прорастание смеси семян, %	68±3	85±2	79±4	78±3	79±5
Общий вес растений (корневая система + наземная часть), г	0,6375	0,7585	0,6569	0,6528	0,6425

Было обнаружено, что в условиях эксперимента при поливе ростков пшеницы рабочим раствором бактериальной суспензии № 1 с интервалом 1 раз в неделю отмечалось увеличение общей массы растений (корневой системы и наземной части) пшеницы на 19 %.

Таким образом, в результате исследований было установлено, что рибавирин положительно влияет на микрофлору почвы, увеличивая ее количество и стимулируя рост PGPR – видов бактерий (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*).

Литература

Не-антибиотики на основе рибавирина для сельского хозяйства / К. И. Киенская, Л. С. Донская, Д. А. Матвеева [и др.] // Актуальная биотехнология : материалы XI Междунар. науч.-практ. конф. «Биотехнология: наука и практика». Туапсе, 1–15 сент. 2023 г. С. 27.

Никонович Т. В., Берговина И. Г., Скорина В. В. Оздоровление растений-регенерантов озимого чеснока в условиях культуры *in vitro* при помощи Рибавирина // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. 2011. № 4. С. 77–81.

Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам / И. В. Максимов, С. В. Веселова, Т. В. Нужная [и др.] // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 6. С. 763–775.

Van Loon L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria // New perspectives and approaches in plant growth-promoting Rhizobacteria research. Dordrecht : Springer, 2007. P. 243–254.

СОСТАВ И ПАТОГЕННОСТЬ МИКОБИОТЫ ПОРАЖЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА В УСЛОВИЯХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Е. Г. Козарь¹, И. А. Енгальчева¹, И. А. Ванюшкина²,
Н. А. Синиченко²

¹Федеральный научный центр овощеводства, г. Одинцово, kozar_eg@mail.ru

²Приморская овощная опытная станция – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», Артем, natsinichenko@mail.ru

На юге Дальнего Востока в Приморском крае одним из наиболее вредоносных биотических факторов, влияющих на урожайность томата, являются болезни грибной этиологии [Гнутова, Золотарева, 2011]. Возникновению практически ежегодных эпифитотий способствует климат Приморского края, который обладает рядом нехарактерных для других регионов стрессовых показателей. Это холодная и продолжительная весна, обильные осадки в виде ливней (тайфуны), вызывающие переувлажнение почвы, максимум температур приходится на август, а не на июль; относительно теплые сентябрь и октябрь. В период эпифитотий потери урожая плодов томата вследствие развития болезней могут достигать 60–70 %, поэтому постоянно ведется поиск и создание новых толерантных сортов и гибридов [Основные проблемы ... , 2020]. Но залогом успеха селекции в данном случае является не только ежегодное проведение фито-

мониторинга распространения болезней, но и перманентный контроль разнообразия микробиоты пораженных растений, изучение патогенности и уровня агрессивности выделенных изолятов возбудителей [Lonsdale, Gibbs, 1996].

Одной из наиболее распространенных болезней томата является альтернариоз – возбудители микромицеты рода *Alternaria*. Всего к этому роду относят чуть менее 300 видов, среди которых на пасленовых культурах описано около 29 видов. Наиболее вредоносными являются узкоспециализированные крупноспоровые виды *A. solani* Z. R. Zones и *A. linariae* (Neergaard) Simmons [Орина, Ганнибал, Левитин, 2010]. Борьба с альтернариозом осложняется очень высокой изменчивостью возбудителей, позволяющей им быстро приспосабливаться к новым устойчивым сортам растений и к новым фунгицидам. В Приморском крае альтернариоз поражает преимущественно листовую поверхность растений, и очень редко плоды. Симптомы и степень поражения листьев существенно варьируют не только в зависимости от сорта и года исследований, но и, как показали исследования, сопутствующих видов других микромицетов в составе микробиоты пораженного листа. Так, присутствие мелкоспоровых видов р. *Alternaria* может усиливать восприимчивость растений при инфицировании крупноспоровыми видами, в том числе и за счет стимуляции образования микотоксинов [Chaerani, Voortrips, 2006].

Изучение современного состава микробиоты листьев томата разных сортов с симптомами поражения альтернариозом проводили по классической схеме, используя разные методические подходы. Для выявления общей и поверхностной инфекции – методы влажной камеры и отпечатков на питательной среде Чапека; для определения состава эндогенных микромицетов внутри тканей листа – раскладка на среды частиц пораженных тканей после поверхностной стерилизации и фломбирования. В результате проведенных исследований было установлено, что в составе миксокомплекса пораженных листьев восьми сортов томата обнаружены разные виды альтернариоидных гифомицетов родов *Alternaria* и *Ulocladium*, в их числе *A. solani*, *A. linariae*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *A. arborescens*, *A. tenuissima*; виды рода *Fusarium* с доминированием *F. oxysporum* и *F. culmorum*, два вида рода *Cladosporium*. На отдельных сортах встречались колонии представителей родов *Botrytis*, *Verticillium* и *Penicillium*.

В целом по общей численности выделенных изолятов микромицетов со всех образцов доминировали грибы родов *Fusarium*, *Alternaria* и *Cladosporium*, но их соотношение существенно различалось в зависимости от их локализации на пораженном листе и сорта. Так, микромицеты рода *Cladosporium* преимущественно выделялись с поверхности листа, где их доля от общего числа выросших колоний составила 33–77 %, тогда как с внутренних тканей листа – только 3–22 %. Микромицеты из двух других родов, чаще всего выделялись совместно и примерно в сопоставимом соотношении после поверхностной стерилизации пораженных тканей листа.

В данном случае можно отметить только определенную сортовую специфику. Например, у сорта Таллалихин доминировали грибы р. *Fusarium*, а у сорта Грот – грибы р. *Alternaria*. Всего было проанализировано более 400 колоний грибов, но в чистую культуру были выделены наиболее часто встречающиеся типичные представители каждого вида и рода (около 40 изолятов).

Патогенность и агрессивность этих изолятов проверяли методом заражения отделенных листьев разных по устойчивости сортов во влажной камере путем нанесения мицелиально-агаровых блоков 10-суточных культур, выращенных на питательной среде Чапека. Большинство изолятов проявили патогенные свойства в отношении культуры томата. Доля слабо агрессивных составила около 65 % от общего числа, большую часть из которых составили изоляты из родов *Cladosporium* и *Fusarium*. Среди патогенных изолятов только 20 % проявили высокую вирулентность и уже через две недели после заражения формировали мицелий и конидиальное спороношение в зоне поражения листьев большинства сортов, что свидетельствует о их высокой агрессивности. При этом два изолята *Fusarium* вызывали влажную гниль тканей листовой пластинки без признаков хлороза, а один из них – симптомы, схожие с поражением изолятами альтернариоидных гифомицетов, в которую вошли крупноспоровые виды *A. solani* и *A. linariae* и мелкоспоровый вид *A. alternata*.

Инфицирование отделенных листьев томата суспензией конидий *A. solani* совместно даже со слабо вирулентными изолятами р. *Fusarium*, привело к существенному ускорению развития симптомов и гибели листьев. Уже на 2–3-е сут. в зависимости от уровня восприимчивости сорта на листьях отмечали проявление хлороза и появление некрозов, а 6–10-е сут. – поражение всех листовых пластинок до полного высыхания. При инфицировании смесью *A. solani* с мелкоспоровыми видами альтернариоидных гифомицетов, первые симптомы начинали проявляться через неделю, а значительное поражение листьев (преимущественно в виде некрозов) – только на 20-е сут. от начала эксперимента. Микроскопирование поверхностных смывов с погибших листьев выявило наличие обильного спороношения изолятов *Fusarium* и *A. alternata* на большинстве протестированных сортов, тогда как типичные конидии *A. solani* успели сформироваться к концу эксперимента только на выживших листьях двух относительно устойчивых к альтернариозу сортов.

Таким образом, в патогенезе развития альтернариоза листьев томата в условиях Приморского края могут участвовать не только два узкоспециализированных вида *A. solani* и *A. linariae*, но и мелкоспоровый вид *A. alternata*. При этом скорость распространения и тяжесть проявления болезни могут усугубляться присутствием в микобиоте листа микромицетов других родов, в частности рода *Fusarium*, среди которых обнаружены агрессивные виды в отношении культуры томата.

Литература

- Гнутова Р. В., Золотарева Е. В. Болезни овощных культур и картофеля на Дальнем Востоке России. Владивосток : Дальнаука. 2011. 169 с.
- Орина А. С., Ганнибал Ф. Б., Левитин М. М. Видовое разнообразие, биологические особенности и география грибов рода *Alternaria*, ассоциированных с растениями семейства Solanaceae. // Микология и фитопатология. 2010. № 44 (2). С. 150–159.
- Основные проблемы дальневосточного овощеводства / Н. А. Сакара, А. В. Солдатенко [и др.] // Овощи России. 2020. № 6. С. 3–7.
- Lonsdale D., Gibbs J. N. Effects of climate change on fungal diseases of trees / fungi and Environmental Change. Cambridge : Cambridge University Press, 1996. 1019 p.
- Chaerani R., Voortrips R. E. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance // J. Gen. Plant Pathol. 2006. Vol. 72. P. 335–3473.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ У *MEDICAGO LUPULINA* В СИМБИОЗЕ С *RHIZOPHAGUS IRREGULARIS*

Т. Р. Кудряшова^{1,2}, А. А. Крюков¹, А. П. Юрков¹,
А. О. Горбунова¹, Ю. В. Лактионов¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, t.kudryashova@arriam.ru

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Санкт-Петербург

На сегодняшний день более 30 % (130 млн. га) российских сельскохозяйственных угодий находится в состоянии деградации. За счет антропогенного воздействия нарушается микробный состав почв, что приводит к ухудшению плодородия и снижению урожаев. По данным Росстата наблюдается ежегодный рост применения минеральных удобрений, к 2022 г. их использование достигло 3,43 млн.

Почвенные микроорганизмы, такие как арбускулярно-микоризные грибы (АМГ), представляют собой ключевое связующее звено между растениями и минеральными питательными веществами почвы. Использование микробных препаратов с использованием арбускулярной микоризы (АМ) в настоящее время достаточно распространено в других странах, в то же время в России практически не используется. Грибы АМ положительно влияют на рост и развитие растений хозяев. Однако АМГ играют ключевую роль не только в росте и развитии конкретного растения, но и в функционировании наземных экосистем [Functional Analysis ... , 2021]. Тем самым АМГ являются эффективными в вопросе увеличения плодородности почв и продуктивности сельскохозяйственных культур. Стресс при засухе влияет на жизнь растений во многих аспектах, например, при нехватке воды снижается скорость транспирации в корнях, а также происходит окислительный стресс [Imra, Nadaradjan, Jagadish, 2011]. Грибы АМ обеспечивают растениям значительную устойчивость к засухе (так как нормализуют водный баланс и регулируют транспорт воды), улуч-

шенное поглощение растениями питательных веществ (фосфор, цинк, медь, аммоний, кальций, магний). Благодаря такому влиянию АМ рассматривают в качестве биоудобрения для ведения устойчивого сельского хозяйства. В консорциуме с другими микроорганизмами АМ потенциально может вытеснить классические химические удобрения, которые оказывают разрушительное влияние на окружающую среду и целые экосистемы [Kuila, Ghosh, 2022]. В то же время нет полного понимания механизмов симбиотической эффективности грибов АМ, а именно механизмов воздействия на растение-хозяина. В том числе и генетические аспекты данных механизмов. До сих пор не ясен вопрос влияния АМ на водообмен растений, участия в устойчивости растений к засухе и другим стрессовым факторам. Именно поэтому в работе на примере экспрессии генов интегральных мембранных белков аквапоринов были рассмотрены последствия инокуляции АМ-грибом *Rhizophagus irregularis* растения *Medicago lupulina*.

На территории Российской Федерации вид *M. lupulina* (люцерна хмелевидная) один из наиболее значимых для кормопроизводства, является широко распространенным в мире растением. Люцерна обладает ценными лекарственными свойствами, сидератная и кормовая культура. *M. lupulina* удобна для применения в ремедиации нарушенных земель, так как обеспечивает минерализацию растительных остатков и накопление в почве значительного количества питательных веществ. Наши исследования проводятся на селективной линии MIS-1 *Medicago lupulina* L. subsp. *vulgaris* Koch (облигатно-микотрофная линия), поскольку данный растительный материал удобен тем, что проявляет признаки карликовости в отсутствие инокуляции АМ-грибом; самоопылитель, диплоид с высокой семенной продуктивностью – более 2500 семян с одного растения в условиях выращивания в закрытом грунте. Для инокуляции растений MIS-1 использован отобранный в результате скрининга исследуемых ранее грибов АМ изолят RСAM00320 гриба *R. irregularis* (из коллекции ФГБНУ ВНИИСХМ, г. Пушкин; уточненная идентификация штамма проведена недавно [Крюков, Юрков, 2018]), как обладающий высокой симбиотической эффективностью.

Для выявления и понимания эффективного симбиоза растений с АМ-грибами необходим анализ маркерных-симбиотических генов, ответственных за формирования и развития эффективной АМ со стороны растений хозяев. Аквапорины – это небольшие интегральные мембранные белки, транспортеры воды через биологические мембраны. Эти транспортеры образуют каналы во внутриклеточных и плазматических мембранах, которые облегчают движение воды в любом направлении. Молекулы воды двигаются внутри белковых каналов благодаря электростатическим силам, при этом поток через пору водного канала может проходить, при условии его направления вниз по градиенту потенциала [Chrispeels, Agre, 1994]. К семейству аквапоринов относится 7 различных подсемейств (5 для семенных растений), характеризующихся различной локализацией и функциями.

Была оценена экспрессия 10 различных генов аквапоринов при микоризации растений и ее отсутствии. Несмотря на то что экспрессия выбранных генов аквапоринов менялась в зависимости от срока и варианта растений, особо стоит выделить гены: *NIP2.1* и *NIP4.2* (интегральные нодулин-26-подобные белки), *PIP2.1* (интегральный белок плазматической мембраны), *SIP1.3* (малый основной интегральный белок), *TIP1.1* и *TIP4.1* (интегральные белки тонопласта). Так как в их экспрессии наблюдались наиболее выраженные изменения. Также в рамках транскриптомного анализа модельного растения (люцерна хмелевидная) нами было обнаружено 44 генов аквапоринов. Экспрессия выявленных генов была разнонаправленной, с повышенной и пониженной регуляцией на разных стадиях развития растения хозяина. В настоящее время нами поставлен опыт в условиях недостатка влаги при микоризации и без микоризации. Для выявления аквапоринов наиболее значимых в условиях водного стресса. Оценка будет проведена методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), полученные результаты будут способствовать пониманию развития симбиотических отношений между растениями и грибами АМ, а также созданию микробных препаратов на основе АМГ.

Сельскохозяйственная практика в ближайшие десятилетия XXI в. столкнется с проблемами в производстве необходимого количества здоровой пищи для населения мира из-за нестабильной экономики, изменения климата и деградации биоразнообразия [Quarterly global report, 2020]. Применение АМГ в качестве биостимуляторов может стать эффективной альтернативой классических сельскохозяйственных методов (например, внесения фосфорных удобрений). В будущем это может привести к значительной выгоде вследствие долгосрочного плодородия почвы, улучшения питания растений, а также их защите от абиотических факторов.

Исследования выполнены с использованием оборудования центра коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22-16-00064.

Литература

- Крюков А. А., Юрков А. П. Оптимизация процедуры молекулярно-генетической идентификации грибов арбускулярной микоризы в симбиотическую фазу на примере двух близкородственных штаммов // Микология и фитопатология. 2018. № 52 (1). С. 38–48.
- Chrispeels M. J., Agre P. Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells // Trends Biochem Sci. 1994. Vol. 19. P. 421–425.
- Quarterly global report / FAO Crop Prospects and Food Situation . 2020. С. 1–46.
- Functional Analysis of the Phosphate Transporter Gene MtPT6 from *Medicago truncatula* / Y. Cao, J. Liu, Y. Li [et al.] // Front. Plant Sci. 2021. Vol. 11. Art. 620377.
- Impa S. M., Nadaradjan S., Jagadish S. V. K. Drought stress induced reactive oxygen species and anti-oxidants in plants // Abiotic stress responses in plants. 2011. P. 131–147.
- Kuila D., Ghosh S. Aspects, problems and utilization of Arbuscular Mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture // Curr Res Microb Sci. 2022. Vol. 3. P. 100–107.

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ СОБИОЦИДОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ДРЕВЕСИНЫ

В. Е. Кузнецова, Е. А. Матвеева, Л. А. Беловежец

Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН
Иркутск, uchiha-viksyia@mail.ru

Древесные материалы особенно сильно подвержены всевозможным биоповреждениям [Колотова, Могилевская, 2020]. Довольно часто на древесину комплексно воздействуют биотические и абиотические факторы, что затрудняет точную идентификацию причин разрушения и поиск веществ, способных их предотвратить. Микроскопические грибы при попадании на поверхность древесины способны вызывать целый ряд процессов, приводящих к усилению биокорозии [Зиновьев, Гончарова, 2020]. Существуют макромицеты, использующие разные стратегии, приводящие к разрушению первичных полимеров клеточных стенок древесины, так же большое значение имеют деревоокрашивающие грибы, способные портить внешний вид материалов и способствовать более глубокому повреждению структурных элементов [Goodell, Winandy, Morrell, 2020].

Самым эффективным методом борьбы с деревоповреждающими грибами является использование химических веществ с антисептическим действием (фунгицидов) [Kekalo, Zargaryan, Nemchenko, 2023]. Для защиты древесины необходимы фунгициды, действующие на грибы разных таксономических групп, а также различных по типу метаболизма. В связи с этим целесообразен поиск комплексных антисептических веществ широкого спектра действия.

Целью данного исследования было оценить и сравнить фунгицидную активность неполной медной соли полиакриловой кислоты, как одной, так и в комплексе с 2-октил-2Н-изотиазол-3-оном. В работе использовали метод тест-полосок.

Нами была исследована фунгицидная активность на грибах бурой гнили *Fomitopsis pinicola*, *Laetiporus sulphureus* (2 штамма), белой гнили *Trichaptum laricinum* и деревоокрашивающем микромицете *Trichoderma harzianum*. Использование неполной медной соли полиакриловой кислоты приводит к одинаковому подавлению роста *Fomitopsis pinicola*, *Trichaptum laricinum*, тогда как зона подавления роста *Trichoderma harzianum* существенно более выражена.

Использование комплекса неполной медной соли ПАК с 2-октил-2Н-изотиазол-3-оном (oit) оказалось более эффективным в отношении всех исследуемых грибов. Варьирование концентраций oit показало высокую эффективность подавления всех грибов, за исключением *Trichaptum laricinum*, даже в минимальной концентрации собиоцида (рис.).

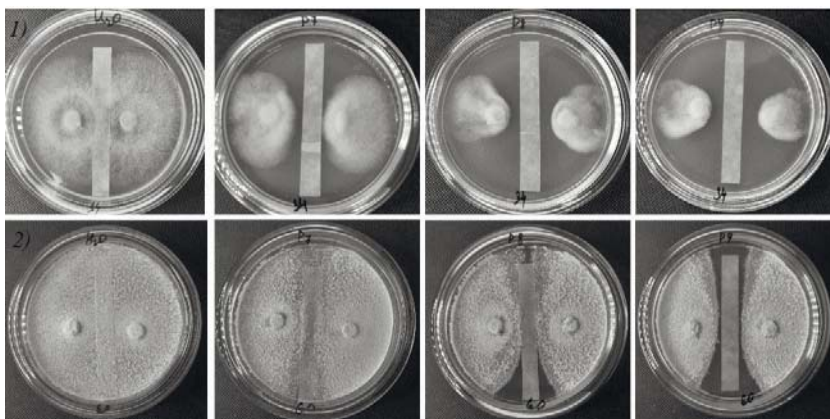


Рис. Фунгицидная активность комплекса неполной медной соли ПАК с oit (увеличение концентрации слева направо), 1) ряд – *Laetiporus sulphureus*, 2) ряд – *Trichaptum laricinum*

Таким образом, проведенные нами исследования позволяют сделать вывод о возможности использования комплекса неполной медной соли ПАК с 2-октил-2Н-изотиазол-3-оном как эффективный фунгицид против различных дереворазрушающих и деревоокрашивающих грибов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 23-26-10008 (<https://www.rscf.ru/project/23-26-10008/>)

Литература

Зиновьев С. В., Гончарова Е. Н. Строительные материалы, устойчивые к биоповреждению // Безопасность, защита и охрана окружающей природной среды: фундаментальные и прикладные исследования : сб. докл. Всерос. науч. конф. Белгород, 19–23 окт. 2020 г. Белгород, 2020. С. 294–298.

Колотова О. В., Могилевская И. В. Процессы микробного биоповреждения в подземных горных выработках // Известия Тульского государственного университета. Науки о Земле. 2020. № 2. С. 44–66.

Goodell B., Winandy J. E., Morrell J. J. Fungal Degradation of Wood: Emerging Data, New Insights and Changing Perceptions // Coatings. 2020. Vol. 10, N 12. Art. 1210.

Kekalo A. Yu., Zargaryan N. Yu., Nemchenko V. V. Effectiveness of fungicidal protection of spring wheat against powdery mildew and tan spot // Siberian Herald of Agricultural Science. 2023. Vol. 53, N 1. P. 45–52. DOI: 10.26898/0370–8799–2023–1-6

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАФТАЛИНА НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ РАСТЕНИЙ ГОРОХА И НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИХ С СИМБИОТИЧЕСКИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Л. Е. Макарова, П. А. Бизиков, А. А. Ищенко, Ю. Б. Олейников

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

Иркутск, bizikov.piotr@mail.ru

Изучение влияния нафталина на физиологические процессы растений гороха (*Pisum sativum* L.) обусловлено его прямым участием в биосинтезе N-фенил-2-нафтиламина (N-ФНА) и фталатов [Нафталин – необходимый ... , 2023], которые многие исследователи относят к аллелопатическим веществам негативного действия. При воздействии нафталина на корни проростков гороха в последних наблюдали существенное повышение содержания вышеназванных соединений [Нафталин – необходимый ... , 2023], причем отмеченное изменение в содержании в основном наблюдалось в апикальной части корня [Изучение негативных ... , 2023], где совершаются такие ростовые процессы, как деление и растяжение клеток. Данное обстоятельство явилось основанием для проведения наблюдений за ростом участков корня, где осуществляются перечисленные ростовые процессы.

В экспериментах исходными служили проростки, которые после проклеивания семян на 24 ч помещали для последующего роста на влажную фильтровальную бумагу (в чашках Петри), смоченную либо водой (контрольный вариант), либо 10^{-4} М раствором нафталина. Далее водостойким маркером на корнях проростков наносили метки на расстоянии 0–2 мм (зона I – меристема) и 2–4 мм (зона II, с перешедшими к растяжению клетками). Для дальнейшего роста проростки обоих вариантов помещали на фильтровальную бумагу, смоченную водой, и проводили измерения длины помеченных отрезков и всего корня через 2, 4, 6, 8, 24, 48 ч. Окончание экспозиции определялось началом появления вторичных корней, которое, как оказалось, у обоих вариантов проростков произошло одновременно.

24-часовой рост проростков на растворе нафталина приводил к заметному повышению в их корнях содержания N-ФНА. В корнях обоих вариантов наблюдали повышение содержания данного соединения к концу эксперимента, при этом более выраженное в корнях проростков, испытавших действие нафталина. Суммарное количество фталатов, выраженное в микромолях на грамм сырой массы всего корня, мало отличалось у обоих вариантов в корнях исходных растений и по окончании эксперимента. При этом к концу эксперимента оно несколько снижалось.

На фоне повышенного содержания N-ФНА в корнях проростков, испытавших действие нафталина, заметно замедлялся рост только зоны II, где рост клеток растяжением завершился за 8 ч экспозиции в корнях обоих вариантов, и длина данного участка оказалась больше у растений контроля (рис. 1).

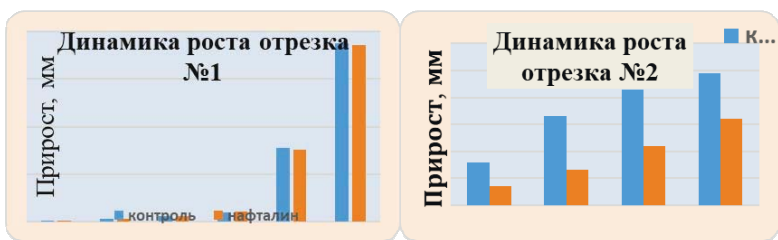


Рис. 1. Влияние 10^{-4} М нафталина на рост в апикальной области корня 2 растущих участков. Участки корня № 1 и 2 были помечены у исходных проростков, соответственно, на расстоянии 0–2 мм и 2–4 мм от кончика корня.

При изучении влияния нафталина на процесс прорастания семян гороха, который в основном обусловлен ростом в длину гипокотиля, установлен положительный эффект данного соединения при концентрации 10^{-4} М (рис. 2). При концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М также наблюдали положительный эффект на прорастание, хотя и менее выраженный, который проявлялся в течение только 2 сут.

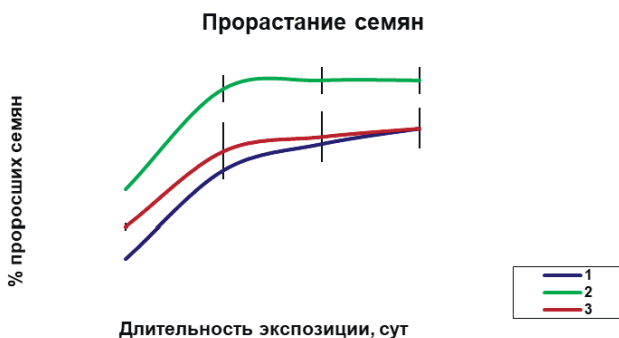


Рис. 2. Влияние нафталина на прорастание семян гороха: 1 – контроль – рост проростков на воде; 2, 3 – роста на 10^{-4} М и $2 \cdot 10^{-4}$ М нафталине, соответственно

При изучении влияния нафталина на нодуляцию корней гороха в качестве исходных использовали также проростки, росшие в течение 1 сут. на растворе нафталина или на воде (контроль), которые высаживали в горшки с вермикулитом, куда вносили минеральные соли и ризобияльный инокулят. У этих растений, испытавших действие нафталина, замечено некоторое запаздывание развития листового аппарата, однако на времени появления клубеньков каких-либо последствий действия нафталина не выявлено.

Показано, что в период роста проростков на нафталине происходили изменения в концентрации и составе эндофитных бактерий в корнях проростков гороха.

Полагаем, что выявленные у растений гороха изменения в физиологических процессах при действии и последствии экзогенного нафталина, обусловлены усилением биосинтеза N-ФНА после его проникновения в растительные клетки.

Литература

Изучение негативных аллелопатических соединений у растений гороха посевного (*Pisum sativum* L.): материалы Всерос. науч. конф. «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды» / П. А. Бизиков, А. А. Ищенко, Л. Е. Макарова, И. Г. Петрова. Иркутск : Изд-во ИГУ, 2023. С. 21.

Нафталин – необходимый метаболит для образования N-фенил-2-нафтиламина и фталатов в растениях гороха (*Pisum sativum* L.) / Л. Е. Макарова, А. А. Ищенко, П. А. Бизиков [и др.] // Химия растительного сырья. 2023. № 1. С. 127–133.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКОРИЗАЦИИ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ *NTEXPA5*, *ATGSTF11* И *ARGOS-LIKE*

Я. П. Минеев, Х. Г. Мусин, Б. Р. Кулуев

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, kuluev@bk.ru

Арбускулярный микоризный гриб *Rhizophagus irregularis* является одним из важнейших симбионтов высших растений, искусственное выращивание которых без растения-хозяина сопряжено с рядом трудностей. Волосовидные корни (от англ. *hairy roots*), получаемые в процессе генетической трансформации растений бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, могут выступить потенциальной заменой растения-хозяина в процессах биотехнологического выращивания арбускулярных микоризных грибов. Ранее нами были получены совместные *in vitro* культуры волосовидных корней моркови с микоризными грибами *R. irregularis* и проведен их микроскопический анализ на разных стадиях микоризации. По результатам морфометрического анализа отмечено замедление темпов роста волосовидных корней при взаимодействии с микоризой в первые две недели по сравнению со стерильными культурами волосовидных корней. Полученные совместные культуры волосовидных корней моркови с *R. irregularis* могут быть использованы в фундаментальных исследованиях арбускулярной микоризы, а также предложены для получения микоризных био-препаратов в биотехнологическом производстве, так как в питательной среде обнаружено накопление спор *R. irregularis*. В дальнейшем нами были проведены испытания культуральной жидкости, получаемой при выращивании *R. irregularis* с волосовидными корнями на саженцах деревьев, выращиваемых в контейнерах. Обработанные разбавленной в 100 раз культуральной жидкостью саженцы лапины ясенелистной (*Pterocarya fraxinifolia*) и клена полевого (*Acer campestre*) отличались достоверным

улучшением ростовых параметров. Целью настоящего исследования стал анализ эффективности микоризации корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией генов *NtEXPA5*, *AtGSTF11* и *ARGOS-LIKE*. Ген *NtEXPA5* кодирует один из экспансинов табака, который при сверхэкспрессии способствует разрыхлению компонентов клеточных стенок [Влияние эктопической ... , 2013], что может облегчить проникновение грибов микоризных грибов в апопласт клеток корней. Ген *AtGSTF11* кодирует один из глутатион-S-трансфераз арабидопсиса, конститутивная экспрессия которого проявляется рядом положительных изменений в антиоксидантной системе [Мусин, Федяев, Кулуев, 2021], что также может улучшить эффективность микоризации. Ген *ARGOS-LIKE* кодирует трансмембранный белок арабидопсиса, который является негативным регулятором этиленового сигналинга [Рост и стрессоустойчивость ... , 2022]. Конститутивная экспрессия данного гена стимулирует рост, в том числе через разрыхление компонентов клеточной стенки, что тоже может оказать позитивный эффект для микоризации.

По две линии трансгенных растений табака с генами *NtEXPA5*, *AtGSTF11* и *ARGOS-LIKE* с доказанной экспрессией трансгенов в корнях были выращены в условиях почвы (универсальный грунт Terra vita, объем сосудов – 500 мл, освещение – 10000 люкс, длина дня – 16 ч, полив – 2 раза в неделю). Инокуляцию спорами *R. irregularis* проводили у половины одномесечных растений табака. Вторую половину растений грибными спорами не инокулировали. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения табака (дикий тип). Размер выборки составил 5 растений для каждого варианта опыта. В течение вегетационного периода трижды проводили морфометрический анализ: измеряли высоту побега, определяли число листьев. На этапе цветения также взвешивали сырую массу побега. Как трансгенные, так и нетрансгенные растения табака инокулированные микоризными спорами характеризовались увеличением высоты стебля, числа листьев и сырой массы побега по сравнению с необработанными растениями. При последнем измерении микоризованных растений наибольшая масса побега была показана для трансгенных растений с геном *ARGOS-LIKE*, а наибольшая высота побега обнаруживалась у трансгенных растений с геном *NtEXPA5*. Трансгенные растения с геном *AtGSTF11* отличались от дикого типа в меньшей степени. После завершения морфометрического анализа был проведен подсчет числа спор *R. irregularis* в грунте, где выращивались растения. Наибольшее количество спор было обнаружено в сосудах, в которых выращивались растения с геном *NtEXPA5*, затем следовали растения с геном *ARGOS-LIKE*. Наименьшее количество спор образовывалось в сосудах с растениями дикого типа. Исходя из полученных нами данных можно предположить, что конститутивная экспрессия генов *NtEXPA5* и *ARGOS-LIKE* способствует улучшению микоризации корней табака.

Литература

Влияние эктопической экспрессии гена *NtEXPA5* на размеры клеток и рост органов трансгенных растений табака / Б. Р. Кулуев, М. Г. Сафиуллина, А. В. Князев, А. В. Чемерис // Онтогенез. 2013. Т. 44, № 1. С. 34–41.

Мусин Х. Г., Федяев В. В., Кулуев Б. Р. Состояние антиоксидантной системы и долгосрочное хранение волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена глутатион-S-трансферазы *AtGSTF11* // Физиология растений. 2021. Т. 68, № 4. С. 380–391.

Рост и стрессоустойчивость волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* / Х. Г. Мусин, Г. Р. Гумерова, Э. А. Баймухаметова, Б. Р. Кулуев // Физиология растений. 2022. Т. 69, № 5. С. 490–500.

УВЕЛИЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ: ВЛИЯНИЕ НА ПОЧВЕННОЕ МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО, ИЗМЕНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ УЛАВЛИВАНИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА РАСТЕНИЯМИ-СИДЕРАТАМИ

П. А. Курынцева, Н. А. Пронович, С. Ю. Селивановская

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань polinazwerewa@yandex.ru

В связи с постоянным ростом населения Земли остро стоит вопрос о сохранении почвенного плодородия, т. е. сохранении углерода в почве, что сопряжено с еще одной целью устойчивого развития – снижением эмиссии парниковых газов, в частности от сельскохозяйственных почв. Одним из возможных подходов является использование сидератов в качестве почвопокровных культур или в качестве промежуточных культур после озимых до заморозков. Поэтому целью работы являлось установить влияние повышенных температур на почвенное микробное сообщество и на эффективность улавливания С из атмосферы растениями-сидератами, используемыми на территории Поволжья.

Для этого был проведен анализ климатических условий за последние 30 лет для республики Татарстан, показано, что среднемесячные дневная и ночная температуры составили в июле – 19,6 °С, в августе – 17,5 °С, в сентябре – 11,2 °С. Далее был проведен 63-дневный вегетационный эксперимент в условиях оранжереи в трех температурных режимах (20 °С – базовый, 25 °С и 30 °С – повышенная температура), содержание СО₂ в атмосфере 390–420 ppm, режим освещенности – свет:темнота 16:8, интенсивность освещения 400–500 Вт/м², относительная влажность воздуха 50–55 %, влажность почвы 55–60 % от общей влагоемкости. Была использована с серая лесная почва, отобранная в районе с. Большие Кабаны (55.640794, 49.319895, Татарстан, Россия). Было подготовлено 15 вариантов, включающих посев сидератов (Донник белый, Донник желтый, Люпин узколистный, Вика яровая, Овес яровой, Фацелия, Редька масляничная, Горох полевой, Рапс яровой, Горчица белая, Горох посевной, Гречи-

ха, Клевер красный, Горчица сарептская, Ячмень яровой), и контрольная почва – без растений. В динамике эксперимента определяли физиологическую активность почвенного микробного сообщества (респираторную активность, микробную биомассу, метаболическую активность почвенного микробного сообщества с помощью системы EcoPlate Biolog). Для растений определяли морфометрические показатели, содержание хлорофилла и интенсивность фотосинтеза. Далее рассчитывали баланс углерода для каждого вида растения-сидерата во всех температурных режимах, как разницу между количеством углерода, уловленного фитомассой растений за период вегетации, и количеством углерода, выделенным из почвы вследствие изменения ее респираторной активности.

Биологическая активность почвы, в частности ее функциональная активность, базальное дыхание и микробная биомасса, тесно связаны химическими характеристиками почвы (содержание микро- и макроэлементов, pH), с механическими характеристиками (плотность, пористость, гранулометрический состав), с климатическими факторами (температура, влажность). Еще одним важным фактором являются растения, так их эксудаты стимулируют почвенные микроорганизмы и ризосферные микроорганизмы, а отмирающие корни изменяют структуру почвы. В данном эксперименте вариативными параметрами были только температура и наличие/отсутствие растений. Показано, что респираторная активность и микробная биомасса были выше в образцах почвы на которой произрастали растения и зависели от вида растений, однако большее влияние оказало повышение температуры. Повышение температуры привело к увеличению степени потребления углеродсодержащих субстратов (увеличение AWCD) и снижению альфа-разнообразия микробных сообществ (снижение индекса Шеннона). Установлены различия в степени потребления углеродсодержащих субстратов в зависимости от наличия/отсутствия растения и температуры.

Далее было оценено влияние температуры на вегетацию растений сидератов. Показано, что увеличение температуры привело к снижению интенсивности фотосинтеза, увеличению длин корня и побега, снижению фитомассы. Далее на основании данных фитомассы и содержания в ней углерода было рассчитано количество CO_2 , которое может быть уловлено в биомассе растений сидератов, а на основании данных респираторной активности было определено количество CO_2 , которое выделяется из почвы при их вегетации. Так максимальной улавливающей способностью характеризовались Рапс яровой, Вика яровая, Горчица белая и Редька масляничная, а максимальная эмиссия была установлена для почвы под Ячменем яровым, Редькой масляничной, Овсом яровым, Люпином узколистным. Наиболее эффективно улавливание углерода в фитомассе растений сидератов происходит при температуре 25 °С, а наибольшая эмиссия была установлена для температуры 30 °С. Полученные данные легли в расчет баланса углерода в системе «почва – растение». Показано, что макси-

мальной способностью улавливать углерод из атмосферного воздуха, фиксировать его в своей фитомассе и не приводить к существенному увеличению эмиссии CO₂ за счет почвенного дыхания обладали Рапс яровой, Вика яровая, Редька масляничная, Горчица белая при температуре 25 °С. Полученные результаты обусловлены большой биомассой растений и несущественным увеличением респираторной активности почвенного микробного сообщества под ними. Стоит отметить, что максимальная скорость улавливания С характеризуются растения с 20-х по 50-е сут. вегетации, что соответствует условиям незрелых семян и ограниченного срока вегетации после уборки озимых культур.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00275, <https://rscf.ru/project/23-26-00275/>

БИОКОНТРОЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ РИЗОБАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 2137 НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФИТОПАТОГЕННОГО ГРИБА *FUSARIUM CULMORUM* И РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ

**М. И. Лебединский, В. Ю. Шахназарова, Д. С. Сырова,
Н. А. Вишневская, А. И. Шапошников, Е. В. Бородина,
О. К. Струнникова, А. А. Белимов**

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, Санкт-Петербург, lebedin21@bk.ru

Fusarium culmorum – факультативный гембиотрофный патоген, вызывающий корневые и стеблевые гнили, а также фузариоз колоса зерновых культур [Wagacha, Muthomi, 2007]. Ризобактерия *Pseudomonas fluorescens* 2137 (Pf2137) является одним из агентов биоконтроля фузариозной корневой гнили. В предыдущих исследованиях было установлено, что *F. culmorum* 30 (Fc30) и Pf2137, совместно колонизируя корни ячменя, конкурировали друг с другом, что приводило к снижению на корнях количества не только гриба, но и бактерии, по сравнению с растениями, инфицированными только грибом или только бактерией [Струнникова, Вишневская, Тихонович, 2010]. Тем не менее, присутствие Pf2137 на корнях всегда сопровождалось существенным уменьшением интенсивности корневой гнили, вызываемой Fc30. Было сделано предположение, что биоконтрольный механизм Pf2137 связан со способностью данного штамма стимулировать защитные реакции в ячмене. При микроскопировании корней было также отмечено, что в присутствии бактерии Pf2137 зоны некроза в месте локализации колоний гриба Fc30 наблюдались гораздо реже, чем в корнях без бактерии [Роль конкуренции ... , 2011]. Это позволило предположить, что биоконтрольный механизм

Pf2137 также может быть связан и со способностью данного штамма снижать продукцию грибом Fc30 трихотеценовых токсинов, в синтезе которых участвует ген *TRI13*.

Для прояснения механизмов защитного действия Pf2137 мы оценили уровень экспрессии генов хозяйской защиты *LOX*, *PAL*, *PR1*, *PR4* и гена *TRI13* в корнях ячменя, инокулированного только Pf2137, только Fc30 и совместно грибом и бактерией. Эксперимент был проведён в стерильном вермикулите в течение 11 сут. в трёхкратной повторности. В стерильный увлажнённый вермикулит вносили суспензии клеток Pf2137 и/или макроконидий Fc30, и помещали проросшие семена ячменя. Растения для анализов отбирали на 1-е, 2-е, 3-и, 4-е и 11-е сут. Корни растений замораживали в жидком азоте и выделяли РНК. Затем с помощью обратной транскрипции получали кДНК, в которой методом ПЦР в реальном времени определяли относительное количество копий генов ячменя *LOX*, *PAL*, *PR1*, *PR4*, *GAPDH* (референсный) и генов гриба *TRI13* и *TUB* (референсный). Интенсивность корневой гнили оценивали на 11-е сутки.

Результаты исследования показали, что в присутствии Pf2137 продукция грибом токсинов, оценённая по уровню экспрессии гена *TRI13*, не снижалась, а в отдельные дни анализа даже возрастала. В то же время количество больных растений ячменя снижалось с 85 % при колонизации только грибом Fc30 до 15 % при совместной колонизации грибом Fc30 и бактерией Pf2137. Возможно, отмеченное при микроскопировании снижение количества зон некроза в присутствии Pf2137 связано с детоксикацией этой бактерией трихотеценов или с индукцией этой способности у ячменя. Однако это предположение требует дальнейших исследований.

Колонизация корней ячменя бактерией Pf2137 сопровождалась увеличением уровня экспрессии только гена *LOX* на 4-е сутки. В ответ на колонизацию Fc30 в ячмене индуцировались на более высоком уровне гены *LOX* на 3-и и 4-е сут. и *PAL* на 1-е, 4-е и 11-е сутки. Совместное присутствие гриба и бактерии индуцировало усиление экспрессии генов *LOX*, *PAL*, *PR1* и *PR4* уже на первые сутки после инфицирования, по сравнению с контрольными растениями. Одновременное увеличение экспрессии генов *PAL* и *LOX* подтверждало участие как салицилатного, так и жасмонового сигнальных путей в индукции устойчивости ячменя к фузариозной корневой гнили, вызываемой гембиотрофным патогеном Fc30. Было установлено, что биоконтрольный эффект Pf2137 обусловлен способностью этого штамма активировать защитные реакции уже в суточных корнях ячменя, но только в присутствии Fc30.

Таким образом, проведённые эксперименты показали, что защитный эффект Pf2137 обусловлен ранней активацией всех изучаемых защитных генов ячменя. При этом штамм Pf2137 способен значительно снижать заболеваемость ячменя даже при активизации синтеза грибом трихотеценов, т. е. при усилении агрессивности Fc30, что позволяет рассматривать этот штамм в качестве перспективного агента биоконтроля фузариозов зерновых культур.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2022-320 от 20.04.2022 г о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

Роль конкуренции между *Pseudomonas fluorescens* 2137GUS и *Fusarium culmorum* за колонизацию корней ячменя / О. К. Струнникова, А. С. Феоктистова, Н. А. Вишневецкая, В. К. Чеботарь // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45, № 4. С. 362–369.

Струнникова О. К., Вишневецкая Н. А., Тихонович И. А. Колонизация корней ячменя *Fusarium culmorum* и влияние *Pseudomonas fluorescens* на этот процесс // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44, № 2. С. 160–168.

Wagacha J. M., Muthomi J. W. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat // Crop Protect. 2007. Vol. 26. P. 877–885.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОЧИСТКИ ПОЧВ ОТ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ

С. Х. Лифшиц, Ю. С. Глянцева, О. Н. Чалая, И. Н. Зуева

Якутский научный центр СО РАН, обособленное подразделение
Институт проблем нефти и газа СО РАН, Якутск, lifsara@yandex.ru

Современное общество характеризуется высоким потреблением углеводородного сырья. В результате возрастает число аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, что оказывает негативное влияние на состояние окружающей среды. Наиболее безопасными в настоящее время являются биологические методы очистки нефтезагрязненных почв, которые включают либо интродукцию углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в почву, либо стимуляцию собственной почвенной микрофлоры [Солнцева, 1998]. Для доочистки почв обычно используют метод высевания толерантных к нефтезагрязнению травянистых растений [Нефтезагрязненные биоценозы ... , 2008]. Для ускорения процессов трансформации нефти и достижения синергетического эффекта рассмотрена возможность совмещения различных методов биологической очистки.

С этой целью на территории одной из нефтебаз Республики Саха (Якутия) были проведены натурные эксперименты, для чего были выделены 4 участка с близким уровнем нефтезагрязнения. На участке № 1 были посеяны только толерантные к нефтезагрязнению травянистые растения: травосмесь состава 80 % клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) и 20 % донника лекарственного (*Melilotus officinalis* (L.) Pall). Второй участок был обработан микробиологическим препаратом: консорциумом выделенных из той же почвы аборигенных УОМ [Биоремедиация нефтезагрязненных ... , 2022]. Третий участок обработали тем же биопрепаратом

и выселили семена той же травосмеси. Четвертый участок служил контролем и ничем не обрабатывался. Эксперимент длился 3 месяца. Результаты эксперимента до и после очистки представлены в таблице.

Таблица

Результаты экспериментов по биологической очистке почв от нефтезагрязнений

Характеристика загрязнителя	Участок № 1		Участок № 2		Участок № 3		Участок № 4	
	до	после	до	после	до	после	до	после
Уровень загрязнения, г/кг почвы	10,76	7,11	10,12	3,66	10,98	1,42	13,77	12,76
Степень деструкции, %		33,9		63,9		87,1		7,3
Состав нефтезагрязнения:								
углеводороды, %	59,3	56,7	58,4	43,5	64,6	31,3	55,4	53,8
смолы, %	39,5	41,4	40,3	55,1	34,3	62,8	40,1	39,8
асфальтены, %	1,2	1,9	1,3	1,4	1,1	5,9	4,5	6,4

Видно, что степень деструкции нефтезагрязнения на участке № 3, который был одновременно обработан биопрепаратом, и на нем высевались растения, составила 87,1 %. Только высевание травосмеси на участке № 1 позволило достигнуть эффективности в 33,9 %. На участке № 2 без произрастания растений только за счет внесения биопрепарата была достигнута степень деструкции 63,9 %. В отсутствии очистительных мероприятий этот показатель составил всего 7,3 %. В процессе очистки изменился групповой состав нефтезагрязнителя. Уменьшилось содержание углеводородов, возросла доля асфальтово-смолистых компонентов, особенно смол (см. табл.). То есть в почвах протекали процессы окислительной деструкции нефтезагрязнения, особенно активно на третьем участке под влиянием микробно-растительных сообществ. Увеличение эффективности очистки при внесении в почву микробно-растительных сообществ связано, по-видимому, со следующими факторами. Интродукция УОМ способствует быстрой биодеградации нефтезагрязнения. Это уменьшает фитотоксичность загрязненных почв, ведет к увеличению всхожести высаженных семян и выживаемости проростков. Произрастание растений, в свою очередь, сдерживает миграцию нефтезагрязнения на близлежащие участки. Образование растительного покрова препятствует пересыханию почвы, образованию корки, что важно для сохранения УОМ высокой микробиологической активности. Кроме того, растения через ризосферу (симбиотические микроорганизмы) положительно влияют на деструкцию нефти и нефтепродуктов.

Растения, произрастающие на нефтезагрязненной почве, адаптируясь к токсичной среде, используют в своем арсенале все возможные механизмы защиты: от увеличения активности антиоксидантных систем и систем репараций ДНК до включения апоптоза и SOS-репараций, а часть продуктов биодеградации нефтезагрязнений используются растениями в каче-

стве питательной среды [Трансформация нефтезагрязнения ... , 2010]. При высоких загрязнениях часть растений погибает, однако те проростки, что смогли адаптироваться и выжить, на следующий год дают многочисленные всходы. Вследствие этого целесообразно высевать многолетние растения, так как сформированный ими адаптивный потенциал не теряется и проявляется в потомстве. Это способствует более быстрому восстановлению экосистем нарушенных земель.

Таким образом, биотехнологический результат рассматриваемого метода очистки заключается в достижении синергетического эффекта, когда каждое из проведенных мероприятий (интродукция УОМ и высевание устойчивых к нефтезагрязнению многолетних травянистых растений) усиливает положительный эффект другого, способствуя реализации положительных обратных связей.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (рег. № 122011200369-1) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ФИЦ ЯНЦ СО РАН.

Литература

- Биоремедиация нефтезагрязненных почв в климатических условиях Крайнего Севера / Л. А. Ерофеевская, Ю. С. Глузнецова, И. Н. Зуева [и др.]. Новосибирск : СО РАН, 2022. 132 с.
- Трансформация нефтезагрязнения и формирование адаптивной реакции растений в модельном эксперименте с мерзлотной почвой Якутии / С. Х. Лифшиц, О. Н. Чалая, М. М. Шашурин [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. 2011. № 2. С. 169–178.
- Нефтезагрязненные биоценозы / А. А. Обороин, В. Т. Хмурчик, С. А. Иларионов [и др.]. Пермь : УрО РАН; Изд-во Перм. гос. ун-та, 2008. 511 с.
- Солнцева Н. П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. М. : Изд-во МГУ, 1998. 376 с.

ОЦЕНКА БИОФОРТИФИКАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА Zn-СОЛЮБИЛИЗИРУЮЩИХ PGP-РИЗОБАКТЕРИЙ ПРИ ВНЕКОРНЕВОЙ ПОДКОРМКЕ *PISUM SATIVUM* L. РАЗНЫМИ ФОРМАМИ ЙОДА

**М. Г. Малева, Г. Г. Борисова, К. Ч. Ахамуэфуле, А. Салата,
М. Дарказанли**

Уральский федеральный университет им. первого Президента России
Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, maria.maleva@mail.ru

Одним из наиболее перспективных подходов к решению проблемы сбалансированного питания населения является биофортификация, или обогащение растительного сырья и продуктов растениеводства не только дефицитными макро- и микроэлементами, но и биологически активными соединениями и антиоксидантами [García-Bañuelos, Sida-Arreola, Sánchez, 2014]. Особый интерес вызывает микробиологическая биофортификация,

которая предполагает использование ростстимулирующих (Plant Growth Promoting, PGP) бактерий для повышения биологической ценности сырья и пищевых продуктов [Modulation in biofertilization ... , 2022]. Наиболее перспективными являются PGP-ризобактерии (PGPR), обладающие способностью солюбилизировать недоступные для растений соединения цинка и фосфора, продуцировать сидерофоры, а также синтезировать фитогормоны [Effect of plant ... , 2012]. Целью работы была оценка биофортификационного потенциала двух селективных штаммов Zn-соллюбилизирующих PGPR (*Pantoea* sp. STF1 и *Pseudomonas* sp. STF13) в сочетании с технологией внекорневого биообогащения йодом проростков *Pisum sativum* L. (горох посевной, сорт Мадрас).

Бактериальные культуры были выделены из ризосферы *Tussilago farfara* L. (сем. Asteraceae), произрастающей на территории Сафьяновского медно-цинково-колчеданного месторождения (г. Реж, Свердловская область). Для получения изолированных колоний около 10 г ризосферной почвы смешивали с 90 мл фосфатного буфера (pH 6,5) и встряхивали при 180 об./мин в течение 2 ч при 28 °С. Затем делали серию разведений каждого образца, и далее по 100 мкл добавляли в чашки Петри с агаризованной средой LB (Луриа-Бертани) с внесением 100 мг/л Zn и Fe (в сульфатной форме) и 75 мг/л циклогексамида. Культуры инкубировали при 28 °С в течение 3 сут. В общей сложности было выделено около 150 изолятов, из которых было отобрано 16 морфологически различных бактериальных штаммов, для проверки их устойчивости к Zn и Fe, способности к соллюбилизации недоступных форм Zn и продукции сидерофоров. Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении Zn и Fe, изоляты выращивали на агаризованной среде LB с добавлением металлов в диапазоне 0,5–2,5 г Zn/л и 1,0–9,0 г Fe/л. Оценку МИК проводили по росту бактериальных культур до его угнетения. Для определения Zn-соллюбилизирующей способности изоляты культивировали на солевом агаре (Mineral Salt Medium, MSM) [Bhakat, Chakraborty, Islam, 2021] с добавлением 0,1 % ZnO, ZnCO₃ или Zn₃(PO₄)₂ в течение 2 сут. при 28 °С. Продукцию сидерофоров оценивали по модифицированному методу [Bioaugmentation with copper ... , 2021] с использованием Fe-CAS (хромазуrol S) агара. Зона ареола вокруг колонии бактерий подтверждала соллюбилизацию цинка/продукцию сидерофоров. Эффективность Zn-соллюбилизации/продукции сидерофоров рассчитывали, как отношение диаметра соллюбилизированной зоны (гало + колония) к диаметру колонии × 100 %.

После скрининга бактериальных изолятов по ранее тестируемым PGP-способностям и наибольшей устойчивости к Zn и Fe было отобрано 2 штамма – STF1 и STF13, которые были идентифицированы как принадлежащие родам *Pantoea* (STF1) и *Pseudomonas* (STF13) первоначально на основе их морфологических и физиолого-биохимических тестов, а затем с помощью секвенирования генома 16S рРНК. Далее было проведено их тестирование на способность к соллюбилизации фосфатов, продукции индо-

лил-3-уксусной кислоты (ИУК) [Bioaugmentation with copper ... , 2021] и устойчивости к KI и KIO₃ (в диапазоне 0–0,1 %).

Оба штамма были одинаково устойчивы к высоким концентрациям Zn (до 2 г/л) и Fe (до 9 г/л) и обладали хорошими PGP-способностями. Однако STF1 обладал более высокой эффективностью продукции сидерофоров (до 310 %), в то время как STF13 – эффективностью Zn-солюбилизации (ZnO – 186 %; ZnCO₃ – 350 %; Zn₃(PO₄)₂ – 375 %). При этом у штамма STF13 способности к солюбилизации фосфатов и синтезу ИУК были выше в 2,5 и 1,4 раза, соответственно, по сравнению с STF1. Йодный тест не выявил неблагоприятного влияния KI и KIO₃ на рост исследуемых штаммов даже при концентрации 0,1 %.

Зрелые семена гороха подвергали поверхностной стерилизации, промывали стерильной H₂O_{дист.} и оставляли в ней на ночь. Затем их инокулировали в течение 1 ч отобранными штаммами. Культуры предварительно выращивали на среде LB, затем отделяли от нее центрифугированием и разводили в стерильной H₂O_{дист.} до оптической плотности 10⁸ КОЕ/мл. Контролем служили неинокулированные семена. Далее горох высаживали в контейнеры объемом 3 л (по 100 семян в каждый, 3 повторности) на предварительно дважды автоклавированный (130 °C) торфяной субстрат (pH 5,42), производитель ГК «Селигер-Агро», Россия. На 7-й день вегетации проростки опрыскивали 0,01 % водным раствором KI или KIO₃; эту процедуру повторяли на 9 и 11 день. Общее время вегетации – 21 день. Эксперимент повторяли дважды, полученные результаты усредняли. Для оценки значимости влияния факторов проводили дисперсионный анализ (ANOVA, Statistica 13.0). Достоверность различий между вариантами оценивали с помощью критерия Дункана для множественного сравнения.

Обнаружено, что инокуляция семян гороха STF1 и STF13 увеличивала сырую и сухую надземную биомассу трехнедельных проростков (в среднем на 16 %). Внекорневая подкормка KI или KIO₃ почти не влияла на рост растений, однако приводила к значительному накоплению йода в биомассе побега (в среднем в 17 раз). Отмечено положительное влияние PGPR на содержание фотосинтетических пигментов в листьях гороха. Дополнительное опрыскивание KI или KIO₃ способствовало еще большему увеличению содержания хлорофиллов и каротиноидов (в среднем на 30 %); при этом наибольшее влияние оказывал штамм STF1. Содержание растворимых фенольных соединений, включая флавоноиды, в листьях гороха также зависело от обоих факторов. Оно достоверно увеличивалось лишь у растений, инокулированных STF1 (на 25 %). Опрыскивание йодом стимулировало синтез фенолов, однако достоверный эффект был обнаружен лишь в контроле и при инокуляции STF1. Количество флавоноидов увеличивалось в 2,4 и 1,6 раз при инокуляции STF1 и STF13, соответственно. При этом доля флавоноидов от общего содержания растворимых фенольных соединений возрастала с 50 % у контрольных проростков, до 94 и 76 % в случае STF1 и STF13. Более того, инокуляция гороха обоими

штаммами приводила к достоверному увеличению содержания NPK (в среднем на 18 %), а также Zn и Fe (в среднем на 15 %) в растительной биомассе по завершении вегетации, что подтвердило высокий биофортификационный потенциал выбранных PGPR.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00292, <https://rscf.ru/project/23-26-00292>.

Литература

Bhakat K., Chakraborty A., Islam E. Characterization of zinc solubilization potential of arsenic tolerant *Burkholderia* spp. isolated from rice rhizospheric soil // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2021. Vol. 37, N 3. Art. 39. DOI: 10.1007/s11274-021-03003-8

Bioaugmentation with copper tolerant endophyte *Pseudomonas lurida* strain EOO26 for improved plant growth and copper phytoremediation by *Helianthus annuus* / A. Kumar, Tripti, O. Voropaeva [et al.] // Chemosphere. 2021. Vol. 266. Art. 128983.

Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth, nodulation, and nutrient accumulation of lentil under controlled conditions / M. Zafar, M. K. Abbasi, M. A. Khan [et al.] // Pedosphere. 2012. Vol. 22. P. 848–859.

García-Bañuelos M. L., Sida-Arreola J. P., Sánchez E. Biofortification – promising approach to increasing the content of iron and zinc in staple food crops // Journal of Elementology. 2014. Vol. 19, N 3. P. 865–888.

Modulation in biofertilization and biofortification of wheat crop by inoculation of zinc-solubilizing rhizobacteria / R. C. Yadav, S. K. Sharma, A. Varma [et al.] // Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 13. Art. 777771.

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ, КАТАБОЛИЗИРУЮЩИХ АБК, НА РОСТ РАСТЕНИЙ ПРИ ПЛОТНОМ ПОСЕВЕ

**Е. В. Мартыненко, Л. Б. Высоцкая, А. С. Рябова,
Л. Ю. Кузьмина, Э. Р. Гаффарова, Г. Р. Кудоярова**

Уфимский институт биологии Уфимского ФИЦ РАН
Уфа, evmart08@mail.ru

Рациональное использование пахотных земель с применением оптимальной плотности посева растений – одна из важнейших задач современного сельскохозяйственного производства. Однако попытки получить стабильно высокий прирост урожая, увеличивая плотность посева, не всегда дают желаемый результат. Ранее было показано, что проростки еще в отсутствие реальной борьбы за ресурсы получают световой сигнал о предстоящей конкуренции с соседними растениями и реагируют приводящими к потере урожая изменениями роста и развития, проявляющимися через изменение гормонального баланса. В последние годы ряд исследователей изучают еще более быстрые ответы: снижение скорости транспирации, быстрое изменение роста в отсутствие дефицита воды и питания. Имеются сведения, что подавление синтеза абсцизовой кислоты (АБК) в растении вследствие обработки флуридоном в краткосрочном периоде позволяло избежать снижения показателей роста у конкурирующих растений.

В этой связи может быть перспективным использование бактерий-деструкторов АБК для разработки эффективных биопрепаратов, используемых при умеренно загущенных посевах, и в целом повышающих устойчивость и урожайность сельскохозяйственных культур в условиях умеренного биотического и абиотического стресса. В УИБ УФИЦ РАН проведен скрининг более 100 представителей из коллекции микроорганизмов, в результате которого были выявлены около десятка бактерий из разных родов, способных разрушать АБК. Идентифицированы и внесены в международную базу данных GenBank представители рода *Pseudomonas*, проявившие стимуляцию прорастания семян и активацию роста проростков пшеницы. Изучение влияния отобранных штаммов на рост растений пшеницы в лабораторных опытах при увеличении плотности посева растений в вегетационных сосудах показало наибольшую эффективность штаммов *P. plecoglossicida* 2.4-D и *P. veronii* IB K11-1. Эти бактерии проявляли разную способность влиять на рост массы побега и корня: то или иное сочетание снижения концентрации АБК в почве и в растении характеризовалось определенными особенностями роста.

При обработке растений салата *P. plecoglossicida* 2.4-D в двух концентрациях, максимальная доза внесенной бактерии в течение первых двух недель почти полностью нивелировала снижение показателей роста на фоне поддержания высоких значений индекса азотного питания. При этом обработка приводила к снижению содержания АБК в песчаном субстрате и побегах растений. Поскольку бактерии могут вызвать не только снижение содержания АБК в субстрате, но и повлиять на гормональный баланс и перераспределение целого комплекса гормонов в растении, необходимо изучение механизмов влияния бактерий на эти процессы. По нашим данным обработки растений салата бактерией *P. plecoglossicida* 2.4-D и растений пшеницы *P. plecoglossicida* 2.4-D и *P. veronii* IB K11-1 привели к изменению динамики и содержания ИУК и ЦК.

Для изучения влияния отобранных штаммов бактерий на рост растений пшеницы высаживали по 6 проростков, а в загущенном посеве – 20 двухдневных проростков в один горшок. Неинокулированные растения служили в качестве контроля. Инокуляция прикорневой зоны приводила к снижению содержания абсцизовой кислоты в песчаном субстрате и в побегах растений пшеницы, а также позитивно влияла на ростовые и биохимические показатели растений по сравнению с необработанным контролем. К концу эксперимента стимуляция накопления массы конкурирующих растений была больше, чем у одиночных.

Снижение содержания абсцизовой кислоты в растениях пшеницы при обработке АБК-деградирующими бактериями можно рассматривать как механизм положительного действия микроорганизмов в условиях плотного посева. Поэтому можно рекомендовать их использование в качестве перспективных для создания рострегулирующих биопрепаратов, уменьшающих негативные последствия конкуренции.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-26-00104

ФИТОПАТОГЕННЫЕ МИКРОМИЦЕТЫ РОДА *FUSARIUM* НА КУЛЬТУРЕ СВЕКЛЫ СТОЛОВОЙ

К. С. Мухина, Е. Г. Козарь, С. А. Ветрова

Федеральный научный центр овощеводства, Одинцово
kseniyamukhina@yandex.ru

В условиях Московской области серьезный ущерб корнеплодным культурам во все исследуемые годы наносит кагатная гниль корнеплодов, вызываемая комплексом фитопатогенов [Resistance of carrots ... , 2021]. Проведенный в лаборатории иммунитета ФГБНУ ФНЦО мониторинг патогенного комплекса на зараженных корнеплодах свеклы столовой в течение последних 40 лет свидетельствует об изменении его структуры, смене доминирующих видов, повышении вирулентности и агрессивности ранее малопатогенных групп микроорганизмов. Причины таких популяционных сдвигов разнообразны и во многом связаны с экологическими факторами, которые определяют взаимоотношения в системе патоген-растение [Тимина, Енгальчева, 2015].

Важнейшим фактором в данной системе является температурный режим агроэкологической ниши. В условиях Московской области отмечается резкое повышение среднесуточной температуры воздуха за последние десятилетие, по сравнению с 70–80-ми гг. прошлого столетия. В связи с чем, начиная с 2000-х гг., по данным многолетнего фитомониторинга, отмечается нарастание распространенности и вредоносности фузариозной гнили корнеплодов свеклы столовой (рис. 1, А). Это объясняется чрезвычайной пластичностью большинства видов рода *Fusarium*, многие из которых, обладая высокой адаптивностью и быстрой изменчивостью, трудноискоренимы [Шёбер-Бутин, Гарбе, Бартельс ... , 2009].

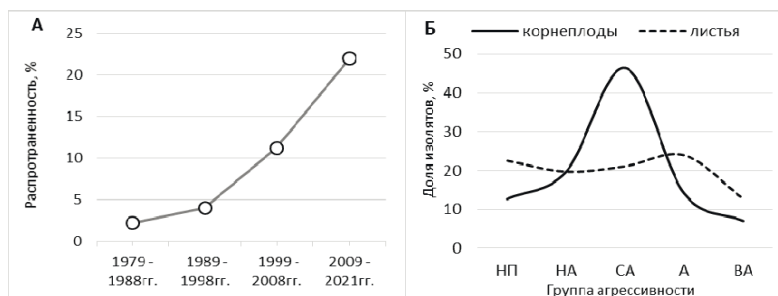


Рис. 1. Динамика распространения фузариоза в Московской области (А), среднее за десятилетние периоды XX и XXI вв. ; распределение выделенных изолятов р. *Fusarium* по группам агрессивности при искусственном заражении корнеплодов и листьев свеклы столовой (Б). Группы агрессивности: НП – непатогенные; НА – низко агрессивные; СА – средне агрессивные; А – агрессивные; ВА – высоко агрессивные

Начиная с 2018 г. в лаборатории молекулярно-иммунологических исследований ФГБНУ ФНЦО ведется выделение грибов рода *Fusarium* из корнеплодов свеклы столовой с различными симптомами поражения, и в настоящее время создана большая коллекция чистых культур микромицетов этой группы, насчитывающая более 70 изолятов. Изучение их патогенных свойств (агрессивность) проводили в условиях *in vitro* методом искусственного заражения дисков корнеплодов и отделенных листьев агарово-мицелиальными блоками десятисуточных чистых культур, выращенных на питательной среде Чапека при температуре 25 °С. В работе использовали корнеплоды и растения четырех сортов свеклы столовой с различным уровнем полевой устойчивости к фузариозу. Повторность пятикратная, контроль – блок чистой среды Чапека. Распределение изолятов по уровню агрессивности проводили на основании измерения объема зоны поражения дисков корнеплодов, проявления симптомов (хлороз, некроз, увядание) и площади поражения листовой пластинки (среднее значение по всей совокупности сортов).

Как видно на рис., Б, при заражении корнеплодов большинство изолятов (46 %) проявили среднюю степень агрессивности (СА). Доля непатогенных (НП) и низко агрессивных (НА) изолятов составила около 33 %, а в группу агрессивных (А) и высоко агрессивных (ВА) вошло только около 20 % изученных изолятов. При заражении листьев отмечен иной характер ранжирования изолятов по степени агрессивности, который отличается от нормального распределения. Основная часть изолятов распределилась практически равномерно по четырем группам – от непатогенных до агрессивных, и их число в каждой из них составило 20–24 % от числа изученных. Однако процент высоко агрессивных изолятов, в данном случае, была почти в два раза выше, чем при заражении корнеплодов (13 % и 7 % соответственно).

Сопоставление уровня агрессивности изученных изолятов в отношении корнеплодов и листьев выявило высокую органоспецифичность их патогенности. В пределах каждой группы агрессивности в отношении корнеплодов присутствовали изоляты *Fusarium*, относящихся к разным группам агрессивности при заражении листьев. При этом во всех группах агрессивности по корнеплодам присутствовали высоко агрессивные изоляты в отношении листьев. С точки зрения результативной селекции на иммунитет, наибольший интерес представляют изоляты, которые проявляют схожий уровень агрессивности на корнеплодах и на листьях свеклы столовой. По данному сочетанию патогенных свойств всего среди изученного коллекционного материала было выделено всего шесть изолятов, которые по морфологическим признакам колоний можно отнести к различным видам *Fusarium*.

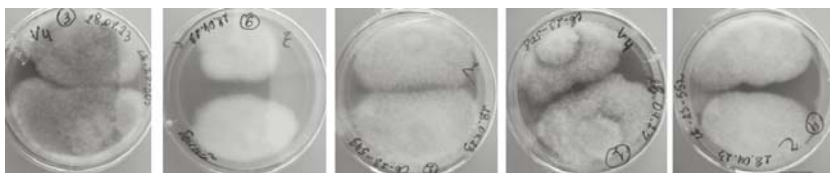


Рис. 2. Внешний вид агрессивных изолятов рода *Fusarium*, выделенных на свекле столовой

В настоящее время проводится их видовая идентификация фитопатологическими и молекулярно-генетическими методами, что позволит их типировать и использовать для иммунологической оценки коллекционного и селекционного материала свеклы столовой на устойчивость к фузариозной гнили.

Литература

Тимина Л. Т., Енгальчева И. А. Комплекс патогенов на овощных культурах в условиях центрального региона РФ // Овощи России. 2015. № 3–4 (28–29). С 123–129.

Шёбер-Бутин Б., Гарбе Ф, Бартельс Г. Иллюстрированный атлас по защите сельскохозяйственных культур. М. : Контэнт, 2009. 232 с.

Resistance of carrots to diseases as a factor of increasing production profitability / I. A. Engalycheva, E. G. Kozar, V. A. Stepanov, A. V. Soldatenko // IOP Conference Series Earth and Environmental Science. 2021. Vol. 650, N 1. Art. 012054. DOI: 10.1088/1755-1315/650/1/012054

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ ДИБУТИЛФТАЛАТА РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РАЗРАБОТОК ВЕРХНЕКАМСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ СОЛЕЙ

А. В. Назаров^{1,2}, А. В. Краева², Ю. И. Нечаева^{1,2}, Е. С. Корсакова^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

В настоящее время дибутылфталат (ДБФ) находит широкое применение в качестве пластификатора пластмасс, кроме того он применяется для производства бытовой химии и косметики [The environmental fate ... , 2007]. Из-за разрушения пластика, а также бытового и промышленного загрязнения ДБФ попадает в окружающую среду и аккумулируется в почве [Occurrence, source ... , 2023]. При этом ДБФ обладает высокой токсичностью, отрицательно влияя на эндокринную систему и репродуктивные функции, а также на ферментативную активность печени человека и животных [Phthalate exposure ... , 2011]. ДБФ также негативно воздействует на почвенные сообщества микроорганизмов и продуктивность растений [Diethyl phthalate ... , 2007]. Одним из способов очистки почв, загрязнен-

ных ДБФ, является фиторемедиация, при которой деструкция загрязнителя осуществляется микроорганизмами, ассоциированными с растениями [Bioremediation of dibutyl ... , 2019]. Однако применение микробно-растительных ассоциаций для биоремедиации почв, загрязненных ДБФ, ограничивает недостаточная изученность бактерий-деструкторов ДБФ ризосферы растений. Также деструкции органических поллютантов микробно-растительных систем, часто препятствуют неблагоприятные экологические факторы, например, засоление почвы.

Цель настоящего исследования – оценка количества бактерий-деструкторов ДБФ и их разнообразия в ризосфере растений бескильницы (*Puccinellia* sp.), произрастающих на засоленной и не засоленной почвах.

Исследования проводились на территории района промышленных солеразработок (г. Соликамск, Пермский край). Были отобраны образцы ризосферы и почвы без растений: 1) с двух участков, расположенных в 1–1,5 м от солеотвала с сульфатным засолением; 2) с участка без засоления в 8 м от солеотвала. Сумма токсичных солей на участках с засолением составляла 0,5–0,6 %, концентрация ДБФ – 7,3 мг/кг, на площадке без засоления сумма токсичных солей – 0,01 %, концентрация ДБФ – 10,3 мг/кг.

В ризосфере изученных растений была выявлена большая численность бактерий-деструкторов ДБФ, чем в почве без растений. На площадке без засоления, в почве без растений, бактерии-деструкторы ДБФ содержалось $(2,5 \pm 1,3) \cdot 10^4$ кл/г бактерий-деструкторов ДБФ, на участках с засолением – $(1,2 \pm 0,6) \cdot 10^4$ кл/г. В ризосфере растений участка без засоления численность данных бактерий составляла $(2,0 \pm 0,8) \cdot 10^6$, с засолением – $(5,0 \pm 2,7) \cdot 10^6$. Из ризосферы растений бескильницы, произраставших на почве без засоления были выделены бактерии-деструкторы ДБФ, принадлежащие к родам *Halomonas*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*. Ризосфера растений, произрастающих в условиях засоления почвы, содержала бактерии-деструкторы ДБФ, относящиеся к родам *Bacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Rhodococcus*.

Таким образом, установлено, что ризосфера растений бескильницы (*Puccinellia* sp.) содержит до 82–514 раз большее количество бактерий-деструкторов ДБФ, чем почва без растений. Полученные данные и выделенные культуры бактерий могут быть использованы для разработки биотехнологических методов очистки почв, загрязненных ДБФ, района промышленных солеразработок.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00308).

Литература

Bioremediation of dibutyl phthalate in a simulated agricultural ecosystem by *Gordonia* sp. strain QH-11 and the microbial ecological effects in soil / X. Kong, D. Jin, X. Tai [et al.] // Science of the Total Environment. 2019. Vol. 667. P. 691–700.

Diethyl phthalate in compost: ecotoxicological effects and response of the microbial community / A. Kapanen, J. R. Stephen, J. Brueggemann [et al.] // Chemosphere. 2007. Vol. 67. P. 2201–2209.

Occurrence, source, ecological risk, and mitigation of phthalates (PAEs) in agricultural soils and the environment / X. Li, Q. Wang, N. Jiang, H. Lv [et al.] // Environ Res. 2023. Vol. 220. Art. 115196.

Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan / S. Lin, H. Y. Ku, P. H. Su [et al.] // Chemosphere. 2011. Vol. 82. P. 947–955.

The environmental fate of phthalate esters / C. A. Staples, D. R. Peterson, T. F. Parkerton, W. J. Adams // Chemosphere. 1997. Vol. 35. P. 667–749.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ *FUSARIUM*

**А. А. Николаева¹, С. А. Хворова¹, М. Т. Лутфуллин¹,
С. Г. Вологин², А. М. Марданова¹**

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, azazel1212@rambler.ru

²Татарский НИИ сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

Картофель занимает четвёртое место по значимости в России среди пищевых культур. Одной из серьезнейших причин потери урожая картофеля является сухая гниль, – распространенное послеуборочное заболевание клубней, вызываемое *Fusarium spp.* и приводящее к большому экономическому ущербу, а также ухудшению параметров качества урожая и накоплению микотоксинов [Хуе, Liu, Yang, 2023]. Повышение урожайности картофеля может быть достигнуто с помощью селекции сортов с генетической устойчивостью к *Fusarium*. При этом определенный сорт может быть чувствительным к одному виду фузариума, но устойчивым к другому, что зависит от вида и штамма возбудителя, а также от особенностей сорта картофеля, культурных и экологических условий выращивания культуры [Ways to increase ... , 2020].

Целью исследования являлся анализ вирулентности штаммов микромицетов рода *Fusarium*, выделенных из сухой гнили, на клубнях различных сортов картофеля.

Исследуемые штаммы микромицетов были выделены из клубней картофеля сортов Ароза (изоляты N1, N3, N5, N8, MG3, H2) и Ягодный 19 (изоляты NS1, NS2, NS3, NS4) с внешними признаками сухой гнили. Для получения чистой культуры образец пораженной ткани клубня подвергали поверхностной стерилизации в 70 % этаноле, а затем переносили на агар Чапека с добавлением молочной кислоты для подавления роста бактерий. Микромицеты культивировали при 30 °С в течение 7 дней.

Скрининг микромицетов *Fusarium* по вирулентным свойствам проводили на клубнях картофеля сортов Регги, Кайо, Дана, Зумба, Догода, Жуковский ранний, Red Scarlet, полученных из коллекции ТатНИИСХ

ФИЦ КазНЦ РАН. Внешне здоровые клубни картофеля искусственно инфицировали внесением 20 мкл споровой суспензии микромицетов (10^6 конидий/мл). В качестве отрицательного контроля использовали клубни, инокулированные обычным стерильным физиологическим раствором. На каждый штамм микромицетов было использовано по 10 клубней каждого из сортов картофеля. Степень поражения клубней на 21-е сут. инкубации оценивали по отношению диаметра гнили к диаметру здоровой зоны клубня по методу, описанному в работе [Fusarium oxysporum ... , 2018] с некоторыми модификациями. Степень поражения клубней выражали в баллах по шкале: 1 балл – отсутствие поражения, 2 – диаметр пораженного участка 1 – 25 %, 3 – 25–50 %, 4 – 50–75 %, 5 – 75–100 % от ткани клубня. Индекс устойчивости сорта картофеля (CRI) определяли по формуле: $CRI = (\sum TH - \sum TA) / \sum T$, где TH – количество здоровых клубней, TA – количество клубней с признаками фузариоза, T – общее количество клубней. Если $1 \geq CRI > 0$, то сорт является устойчивым, если $0 > CRI \geq -1$, то сорт является восприимчивым.

Выделение ДНК проводили с помощью СТАВ-буфера с использованием метода СТАВ (гексадецилтриметиламмония бромид) [Detection and Quantification ... , 2019]. Качество и полученную концентрацию ДНК проверяли на NanoDrop 2000 (Thermo, США). Внутреннюю транскрибируемую спейсерную область (ITS) гена 5.8S рРНК и маркерный локус региона фактора элонгации трансляции 1- α (TEF1) амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК с использованием праймеров ITS1 и ITS4, EF1 и EF2 соответственно. ПЦР-продукты очищали с помощью коммерческих наборов FastDNA® SPIN Kit for Soil согласно протоколу производителя и секвенировали по методу Сэнгера.

После получения данных о последовательностях ДНК обрезку последовательностей низкого качества проводили с помощью Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), для проведения запросов BLASTn для идентификации *Fusarium* использовали доступные через интернет базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

В общей сложности из клубней картофеля с признаками сухой гнили были выделены 10 изолятов микромицетов, идентифицированных на основании макро- и микроскопической морфологии как представители рода *Fusarium*. Все десять штаммов *Fusarium* проявили вирулентные свойства, вызывая сухую гниль в разной степени в клубнях исследуемых сортов. Сравнительный анализ результатов заражения показал, что наиболее вирулентными в отношении использованных сортов картофеля оказались штаммы NS2 со средней степенью вирулентности в 4 балла и N1 со средней степенью вирулентности в 2 балла. Вирулентность остальных штаммов в среднем составляла от 1,5 до 2 баллов. Наиболее восприимчивыми к заражению *Fusarium* сортами оказались Догода (CRI = -0,3) и Red Scarlet (-0,08), а наиболее устойчивыми – Кайо (0,58) и Дана (0,5).

Молекулярно-генетическая идентификация позволила отнести изоляты грибов к следующим видам: семь изолятов (N1, N3, N5, N8, NS3, MG3, H2) были идентифицированы как *Fusarium oxysporum*, два изолята (NS1, NS4) – как *Fusarium redolens* и один (NS2) как *Fusarium solani* со степенью гомологии от 95 до 100 %.

Таким образом, преобладающим видом среди выделенных из сухой гнили фитопатогенных *Fusarium* является *F. oxysporum*. Однако необходимо отметить, что наиболее агрессивным оказался штамм *F. solani*. Было установлено, что степень заражения и повреждений клубней зависит как от вирулентности штамма, так и устойчивости конкретного сорта картофеля. Дальнейшие исследования необходимы для разработки эффективных стратегий борьбы с фузариозом и предотвращения возможных потерь урожая.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-16-00138 на технической базе Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (Приоритет-2030).

Литература

Fusarium oxysporum strains from wilting potato plants: Potential causal agents of dry rot disease in potato tubers / Y. Akosah, S. G. Vologin, M. T. Lutfullin, G. Hadieva // Crops 22. 2021. N 49–53. DOI: 10.31830/2348–7542.2021.012

Detection and Quantification of *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*) and *Magnaportheopsis maydis* in Maize Using Real-Time PCR Targeting the ITS Region / M. Campos, C. Patanita, C. Campos [et al.] // Agronomy. 2019. Vol. 9. P. 45.

Ways to increase the adaptability of potato varieties in the North Caucasus / S. V. Likhnenko, F. T. Zangieva, T. A. Morgoev, B. V. Bekmurzov // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 2020. Vol. 548, N 2. Art. 022038.

Xue H., Liu Q., Yang Z. Pathogenicity, Mycotoxin Production, and Control of Potato Dry Rot Caused by *Fusarium* spp.: A Review // J. Fungi (Basel). 2023. Vol. 9 (8), N 843. DOI: 10.3390/jof9080843

ПРОБЛЕМЫ АННОТАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ И РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

**Е. А. Николайчик, П. В. Вычик, А. В. Дигрис,
Е. И. Дувалов, В. В. Скакун**

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
nikolaichik@bsu.by

Корректный анализ молекулярных коммуникаций в растительно-микробных патосистемах современными высокопроизводительными методами критично зависит от качества аннотации геномов как растения, так и патогена. Однако большинство бактериальных геномных последовательностей содержит только базовую аннотацию открытых рамок считывания, генов рРНК и тРНК. Из-за меньшей консервативности и сложности идентификации промоторы, операторы, терминаторы и др. регуляторные

элементы аннотированы у немногих, преимущественно модельных, организмов, а без этих элементов нельзя понять, когда и на каком уровне могут экспрессироваться гены. Второй проблемой является некорректная аннотация межгенных участков: отсутствие аннотации повторов (включая транспозоны), некорректное указание начала гена, отсутствие аннотации 5'-нетранслируемых элементов (аттенуаторов, рибопереклочателей). Третьей серьезной проблемой является исторически сложившаяся практика присвоения одинаковых названий неродственным генам в разных таксонах (например, *rsmA*, *phoP*), что приводит к ошибкам не только в работе автоматических систем аннотации, но и в публикациях, в основном связанных с анализом геномных и транскриптомных данных.

В настоящей работе мы предлагаем простой протокол качественного улучшения аннотации геномов бактериальных патогенов, способный перевести интерпретацию «омиксных» данных на новый уровень. Протокол требует использования последней версии программы Sigmoid [Nikolaichik, Damienikan, 2016; Nikolaichik, Vychik, 2020], доступной из репозитория (<https://github.com/nikolaichik/sigmoid>), а также стороннего ПО. Часть требуемых для выполнения протокола функций доступна через портал BacRegDB (<http://bacregdb.bsu.by>). Протокол работает со стандартными файлами аннотированных геномных последовательностей в формате GenBank. Для неполных геномных сборок требуется конкатенация контиг в один файл. Примерная последовательность выполнения протокола зависит от конкретных задач, но в общем случае включает 10 стадий:

1. Аннотация транскрипционных терминаторов с помощью функции “Terminator search...” Sigmoid.

2. Аннотация сигнальных пептидов. Функция “Annotate Signal Peptides...” Sigmoid работает с результатами SignalP v.6 [SignalP 6.0 predicts ... , 2022].

4. Аннотация регуляторных элементов РНК с помощью Infernal [Nawrock, Eddy, 2013]. Частично эта задача также решается использованием аннотации RefSeq последних версий, однако ключевые для фитопатогенов регуляторные РНК (например, *rsmB*) конвейер PGAP до сих пор не аннотирует. После аннотации РНК-элементов требуется их включение в состав контролируемого гена (присвоение элементу *locus_tag* и коррекция начальной координаты гена) средствами редактирования Sigmoid.

5. Аннотация мобильных элементов. Аннотация IS может быть выполнена с использованием ISSaga и ISfinder [ISSaga is an ensemble ... , 2011; Exploring Bacterial ... , 2012]. Полный анализ требует детекции мини-элементов (MITE), число которых у большинства фитопатогенов составляет несколько сотен. MITE и другие повторы могут быть идентифицированы с помощью нескольких программ, например MUST и MITE Hunter [MUSTv2: An Improved ... , 2017; Han, Wessler, 2010]. После определения позиций мобильных элементов может потребоваться коррекция аннотации разорванных ими генов, что можно сделать средствами Sigmoid.

6. Идентификация и классификация транскрипционных факторов с помощью функции “List TFs...” Sigmoid или инструмента “TF Classifier” BacRegDB.

7. Идентификация сайтов связывания транскрипционных факторов с известными мотивами (функция “CR tagged Profile Search” Sigmoid или инструмент “Annotation” BacRegDB).

8. Идентификация сайтов связывания транскрипционных факторов с неизвестными мотивами (функция “De novo TFBS Motif Inference” Sigmoid).

9. Анализ оперонной структуры с помощью функции “List Regulons...” Sigmoid.

10. Верификация и коррекция функциональной аннотации целевых генов с помощью контекстного меню “Swiss-Prot, CDD & Literature Search” геномного обозревателя Sigmoid.

Доработанная таким образом аннотация (и отдельные шаги вышеописанного протокола) существенно облегчает исследование растительно-микробных взаимодействий. Примеры часто встречающихся проблем и их решения с помощью нашего подхода в приложении к патосистемам с участием пектобактерий можно найти в работах [Nikolaichik, Damienikan, 2016; RpoS-Regulated Genes ... , 2023; The PhoPQ ... , 2021], новая информация будет представлена на конференции.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования Республики Беларусь (проект № 20211918).

Литература

Exploring Bacterial Insertion Sequences with ISfinder: Objectives, Uses, and Future Developments / P. Siguier [et al.] // Mobile Genetic Elements. Humana Press. 2012. P. 91–103.

Han Y., Wessler S. R. MITE-Hunter: a program for discovering miniature inverted-repeat transposable elements from genomic sequences // Nucleic Acids Res. 2010. Vol. 38, N 22. Art. e199–e199.

ISsaga is an ensemble of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes / A. M. Varani [et al.] // Genome Biol. 2011. Vol. 12. Art. R30.

MUSTv2: An Improved De Novo Detection Program for Recently Active Miniature Inverted Repeat Transposable Elements (MITEs) / R. Ge [et al.] // J. Integr. Bioinforma. 2017. Vol. 14, N 3. Art. 20170029.

Nawrocki E. P., Eddy S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches // Bioinformatics. 2013. Vol. 29, N 22. P. 2933–2935.

Nikolaichik Y., Damienikan A. U. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals // PeerJ. 2016. Vol. 4. Art. e2056.

Nikolaichik Y., Vychik P. New approach to genome-wide automated inference of bacterial transcription factor binding sites // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology. Institute of cytology and genetics, siberian branch of the russian academy of science, Novosibirsk State University. 2020. P. 75–76.

RpoS-Regulated Genes and Phenotypes in the Phytopathogenic Bacterium Pectobacterium atrosepticum / O. Petrova [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, N 24. Art. 17348.

SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models / F. Teufel [et al.] // Nat. Biotechnol. 2022. Vol. 40, N 7. P. 1023–1025.

The PhoPQ Two-Component System Is the Major Regulator of Cell Surface Properties, Stress Responses and Plant-Derived Substrate Utilisation During Development of Pectobacterium versatile-Host Plant Pathosystems / U. Kravchenko [et al.] // Front. Microbiol. 2021. Vol. 11. Art. 621391.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *LYSOBACTER* SP.,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ РИЗОСФЕРЫ ЭНДЕМИЧНОГО РАСТЕНИЯ
ПРИБАЙКАЛЯ *HEDYSARUM ZUNDUKII* (FABACEAE)**

**Ю. В. Нурминская¹, М. С. Кареева¹, Н. Б. Аюшеева²,
И. А. Васильев¹, Ю. В. Маркова¹**

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, marina-tretjakova@yandex.ru

²Иркутский государственный университет, Иркутск
ayuseevanadya@gmail.com

Сравнительно недавно появившийся таксон род *Lysobacter* представляет большой интерес сразу по нескольким причинам. Стабильно обнаруживаемые в ризосфере лизобактерии привлекают внимание своими вторичными метаболитами, зачастую имеющими противомикробные и фунгицидные свойства [Bioactive natural ... , 2012; *Lysobacter* species ... , 2016]. Спектр этих метаболитов, многие из которых являются потенциальными антибиотиками, достаточно широк. Однако лизобактерии рассматривают не только как источник получения новых антибиотиков. Они могут стать источником уникальных генов для нужд геномной инженерии, а также могут быть использованы в составе микробиологических препаратов для защиты растений от патогенных микроорганизмов [Bioactive natural ... , 2012].

На данный момент зарегистрировано более 90 видов *Lysobacter* (<https://lpsn.dsmz.de/search?word=lysobacter>). Каждый вновь открытый вид становится объектом внимательного изучения, так как любой штамм *Lysobacter* потенциально полезен для биотехнологии.

О ризосферных микроорганизмах эндемичных растений байкальского региона известно очень мало. При этом Приольхонье является не только местом произрастания множества эндемичных видов растений. Эта местность характеризуется сочетанием климатических условий Сибири (короткое лето, долгий период, когда почва охлаждена) и засушливого, жаркого климата степных районов (в приольхонье высокая инсоляция в летний период). Это позволяет предполагать, что микроорганизмы почв данного региона обладают устойчивостью как к низкой, так и высокой температурам, а также к дефициту влаги.

В связи с этим обитатели почв этого района представляют для микробиологов особый интерес.

Целью исследования было получить первичные данные о выделенном из ризосферы копеечника зундукского (эндемика маломорского побережья оз. Байкал) новом штамме *Lysobacter* sp. Hz25.

Для проведения экспериментов использовали крахмало-аммиачную среду, среду на ГМФ-основе и среду SYM [Козлов, 2023] в трёх вариантах: полную (SYM-1), с 50 % сахарозы (SYM-2) и с 50 % дрожжевого экстракта (SYM-3).

Изучали следующие параметры: морфологию клеток и колоний на разных средах, способность объединяться в единое сообщество (роение), отношение к кислороду, температуре и кислотности среды, а также скорость деления в жидкой среде различного состава. Также оценивали способность к микрохищническому поведению.

Слизистые колонии *Lysobacter* sp. Hz25 окрашены в беловато-, розовато-, желтовато-кремовый, а также в тёмно-кремовый вплоть до коричневого оттенка в зависимости состава среды и от возраста колонии. Все эти варианты окраски колонии характерны для бактерий рода *Lysobacter*. В статье Zhao et al. [Characterization of *Lysobacter* spp. ... , 2021] также был описан штамм *L. antibioticus* OH13, колонии которого были разного цвета в зависимости от состава среды подобно тому, что наблюдали у штамма *Lysobacter* sp. Hz25.

Известно, что лизобактерии вырабатывают пигменты жёлтых оттенков для защиты от ультрафиолетового излучения, такие как беталаин и ксантоноадин [Puopolo, Tomada, Pertot, 2018]. Эти пигменты могут придавать колониям отмеченный нами желтоватый или кремовый оттенок.

Также иногда отмечали образование коричнево-красных кристаллов в среде. Согласно Christensen and Cook [1978] это могли быть кристаллы антибиотика миксина.

Клетки *Lysobacter* sp. Hz25 были палочковидной формы, однако длина клеток статистически достоверно зависела от плотности заселения среды: при низкой плотности заселения длина составляла около 1,2 мкм, а при высокой – около 0,5 мкм.

Оптимальная для культивирования *Lysobacter* sp. Hz25 кислотность среды была в диапазоне от 5 до 8. По отношению к температуре штамм оказался мезофилом (оптимальная температура 20–25 °С).

Исследуемый штамм, как и многие другие штаммы *Lysobacter*, передвигался скольжением (сворминг), стремясь объединять колонии в единое сообщество (роение). Однако скорость перемещения бактериальных клеток по поверхности твёрдой среды была различной в зависимости от её состава.

Lysobacter sp. Hz25 показал себя как факультативный хищник. При совместном культивировании со штаммами микроорганизмов ризосферы копеечника зундукского *Lysobacter* sp. Hz25 лизировал клетки штаммов Hz47 и Hz102, при этом отмечали перемещение хищника в сторону бактери-жертвы по поверхности твёрдой среды.

Полученные данные станут основой для дальнейших исследований, посвящённых изучению взаимодействия данного штамма с другими микроорганизмами, а также с растениями. Эти исследования дадут возможность предположить, может ли данный штамм использоваться для изготовления микробиологических препаратов для защиты растений от патогенов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-26-00204.

Литература

Козлов А. В. Методы почвенной микробиологии и энзимологии в экосистемных исследованиях : учеб.-метод. пособие для вузов. М. : Плодородие, 2023. 152 с.

Characterization of *Lysobacter* spp. strains and their potential use as biocontrol agents against pear anthracnose / Y. Zhao, T. Jiang, H. Xu [et al.] // Microbiological Research. 2021. Vol. 242. Art. 126624.

Christensen P., Cook F. D. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1978. Vol. 28, N 3. P. 367–393.

Lysobacter species: a potential source of novel antibiotics / S. Panthee, H. Hamamoto, A. Paudel, K. Sekimizu // Archives of microbiology. 2016. Vol. 198. P. 839–845.

Puopolo G., Tomada S., Pertot I. The impact of the omics era on the knowledge and use of *Lysobacter* species to control phytopathogenic micro-organisms // J. Appl. Microbiol. 2018. Vol. 124, N 1. P. 15–27.

Bioactive natural products from *Lysobacter* / Y. Xie, S. Wright, Y. Shen, L. Du // Natural product reports. 2012. Vol. 29, N 11. P. 1277–1287.

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОСФОНАТЫ *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM* КАК ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СОСТОЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНОЙ ПАТОСИСТЕМЫ

О. И. Парфирова¹, О. Е. Петрова¹, Е. Д. Сыромятникова¹,
А. В. Смолобочкин², В. Ю. Горшков^{1,3}

¹Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

²Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова
ФИЦ КазНЦ РАН, Казань

³Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Фитопатоген *Pectobacterium atrosepticum* является широко распространённым возбудителем мягкой гнили растений. Однако взаимодействие пектобактерий с растением может выражаться не только мягкими гнилями, но и бессимптомными инфекциями, при которых патоген и хозяин мирно сосуществуют. Несмотря на то что широко описаны различные типы инфекций, вызываемые пектобактериями, на сегодняшний день не сформировано представление о спектре молекулярных игроков, которые определяют многообразие форм взаимодействия пектобактерий с растениями. То, по какому сценарию будет развиваться патосистема, во многом определяется метаболитами патогена. К настоящему времени у пектобактерий среди низкомолекулярных метаболитов, определяющих стратегию взаимодействия патогена с растениями, описана только корона-фациевая кислота, которая служит в качестве индуктора жасмонат-регулируемых восприимчивых ответов хозяина. В связи с этим мы проводили поиск экстраклеточных метаболитов патогена *Pectobacterium atrosepticum*, принимающих участие в растительно-микробном взаимодействии, и оценивали их роль в развитии растительно-микробных патосистем.

С помощью транскриптомного анализа нами установлено, что при колонизации растения-хозяина повышается уровень экспрессии генов пектобактерий, аннотированных как ферменты биосинтеза фосфонатов. Ранее было установлено, что фосфонат пентафос, продуцируемый фитопатогеном *Pantoea ananatis*, обладает гербицидными свойствами и повышает вирулентность патогена; однако для пектобактерий фосфонаты к настоящему времени не были детектированы и описаны.

Чтобы проверить, действительно ли пектобактерии продуцируют низкомолекулярные экстраклеточные фосфонаты, были подобраны условия *in vitro*, которые индуцируют экспрессию генов, связанных с фосфонатами, и проведена экстракция предполагаемых фосфонатов из супернатантов культур пектобактерий. При помощи ^{31}P ЯМР-спектроскопии нами была показана способность пектобактерий продуцировать низкомолекулярные экстраклеточные фосфонаты. Мутант с делецией гена *fom1*, кодирующего ключевой ген биосинтеза фосфонатов (фермент фосфоенолпируват мутаза), не продуцировал эти метаболиты; но способность к синтезу фосфонатов восстанавливалась у компенсаторного мутантного штамма, несущего целевой ген *fom1* в составе плазмиды.

Нами установлено, что синтез исследуемого соединения зависит как от присутствия индукторов растительного происхождения, так и от функционирования системы межклеточной коммуникации патогена. Данные две системы регулируют продукцию большинства факторов вирулентности пектобактерий, и полученные результаты могли бы свидетельствовать о принадлежности фосфонатов к факторам вирулентности пектобактерий. Однако нами была выявлена повышенная вирулентность фосфонат-дефицитного мутанта пектобактерий в отношении растений с индуцированным иммунным статусом. Оказалось, что неспособность синтезировать низкомолекулярные фосфонаты привела к увеличению активности ключевых факторов вирулентности пектобактерий – пектатлиаз.

Таким образом, мы установили, что фосфонаты, подавляя активность ключевых факторов вирулентности, вносят вклад в пролонгирование бессимптомной стадии взаимодействия пектобактерий и растений. На примере пектолитических бактерий не было ранее описано такого явления, когда фитопатоген продуцировал бы низкомолекулярные репрессоры собственных факторов вирулентности при взаимодействии с хозяином. Такой феномен соответствует представлениям о растительно-микробном взаимодействии, согласно которым патоген стремится нанести минимальный вред своему хозяину, чтобы иметь возможность как можно дольше сохранять свою экологическую нишу в функциональном состоянии, и обнаруженные нами у пектобактерий фосфонаты, по всей вероятности, этому способствуют.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ, ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ЛЮЦЕРНЫ *MEDICAGO TRUNCATULA* С АЗОТФИКСИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ РИЗОБИЯМИ

В. А. Петренко, М. А. Лебедева, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
drpetrenko@yandex.ru

Симбиоз растений семейства Fabaceae с азотофиксирующими бактериями – исключительное явление, позволяющее растениям за счёт эндогенных микросимбионтов усваивать атмосферный азот и проявляющееся в виде образования специальных боковых органов – клубеньках. В окружающую среду растение выделяет флавоноиды, которые являются индукторами генов бактерий, отвечающих за синтез Nod-факторов, которые в свою очередь, связываясь с LysM-подобными рецепторами в корнях растений, запускают сигнальный каскад, запускающий клубенькообразование.

Поскольку данное симбиотическое взаимодействие требует энергетических затрат, то у растений имеется специальная система контроля развития клубеньков, ключевым регуляторным пептидом этой системы является CLE35 – негативный регулятор образования симбиотических клубеньков. У люцерны *Medicago truncatula* со сверхэкспрессией данного гена не происходит образования клубеньков, поскольку подавляется экспрессия генов, задействованных в программе развития клубеньков [Молекулярный диалог ... , 2020]. Однако согласно данным транскриптомного анализа инокулированных ризобиями корней со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* выявлены гены, экспрессия которых, наоборот, увеличивается. Среди них – гены, кодирующие пероксидазы, АСС-синтаза, участвующая в синтезе этилена, тиоредоксин и цистеин-богатые пептиды, выполняющие защитную функцию.

Далее было проведено сравнение генной экспрессии в проинокулированных корнях двух групп композитных растений: контрольных растений со сверхэкспрессией гена *GUS* и растений со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* в корнях. Среди генов с повышенной экспрессией восемь оказались общими, среди них – гены, кодирующие хитиназы и ChOMT1, участвующий в синтезе флавоноидов. Кроме того, в корнях растений со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* было выявлено повышение экспрессии генов, кодирующих малые цистеин-богатые пептиды. Среди них гены, кодирующие пептиды семейства корневых чехликов (RC3 и RC8), GASA (GASA21 и GASA24) и неспецифический белок-переносчик липидов (белки nsLTP), известные как малые цистеин-богатые белки, участвующие в абиотическом стрессе и защитных реакциях растений [Identification and molecular, ... , 2022; From Gene to ... , 2023].

Для дальнейшего изучения этих генов нами были получены стабильные трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *MtCLE35* (35S::*MtCLE35*). Для трёх генов *CHIT_2G*, *CHIT_8G* и *ChOMT1* были подобраны праймеры и проведена количественный анализ экспрессии этих генов в корнях растений через неделю после инокуляции ризобиями с помощью ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР показывают, что экспрессия этих генов увеличивается в корнях растений 35S::*MtCLE35*.

Хитиназы – это ферменты класса гидролаз, которые катализируют расщепление хитина, действуя как эндоферменты, отщепляя олигосахариды длиной в 2–6 N-ацетилглюкозаминовых остатков. Хитин является основным компонентом клеточных стенок грибов и кутикулы артропод, и растения синтезируют хитиназы для защиты от насекомых-фитофагов и патогенных грибов, что подтверждается в ряде работ. В то же время Nod-факторы клубенькообразования по своей химической структуре являются 1,4-олигомером N-ацетилглюкозамина, имеющим N-ацильный заместитель на нередуцирующем конце, а значит, они тоже подвергаются расщеплению под действием хитиназ растения. Таким образом, хитиназы, выделяемые растением, выполняют две важных функции: защита от патогенов и контроль числа симбиотических клубеньков.

Ген *ChOMT1* кодирует фермент халкон-О-метилтрансферазу-1, катализирующий превращение изоликвиритигенина в метоксихалкон. Сообщалось, что ген *ChOMT1* индуцируется патогенами, что позволяет предположить, что активация этого гена также может быть частью защитного пути [Liu, Murray, 2016]. Следовательно, можно предположить, что активация гена *ChOMT1* в ответ на ризобии в корнях, сверхэкспрессирующих *MtCLE35*, может быть частью защитной реакции, однако для подтверждения этого предположения требуются дальнейшие исследования.

Таким образом, данные транскриптомного анализа и результаты ОТ-ПЦР (Real-time PCR) подтверждают предположение, что ингибирование образования клубеньков из-за избыточной экспрессии *MtCLE35* сопровождается активацией защитных процессов в корнях, инокулированных ризобиями. Индукция защитных генов может быть одним из возможных механизмов, лежащих в основе ингибирования программы образования клубеньков.

Литература

Молекулярный диалог корня и побега с участием регуляторных пептидов и его роль в системном контроле развития растений / М. А. Лебедева, Я. С. Яшенкова, И. Е. Додуева, Л. А. Лутова // Физиология растений, 2020, Т. 67, № 6, С. 578–598.

From Gene to Transcript and Peptide: A Deep Overview on Non-Specific Lipid Transfer Proteins (nsLTPs) / C. A. D. Santos-Silva, J. R. C. Ferreira-Neto, V. C. Amador [et al.] // Antibiotics (Basel). 2023. Vol. 12, N 5. Art. 939. DOI: 10.3390/antibiotics12050939

Identification and molecular characterization of a novel non-specific lipid transfer protein (TdLTP2) from durum wheat / K. Missaoui, Z. Gonzalez-Klein, S. Jemli [et al.] // PLoS ONE. 2022. Vol. 17, N 4. Art. e0266971. DOI: 10.1371/journal.pone.0266971

Liu C. W., Murray J. D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update // Plants (Basel). 2016. Vol. 5, N 3. Art. 33. DOI: 10.3390/plants5030033

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОСТИМУЛЯТОРА *RHODOCOCCUS QINGSHENGII* VKM AC-2784D НА МИКРОБИОМ КАРТОФЕЛЯ

И. С. Петрушин, Ю. А. Маркова, А. С. Мориз,
Д. И. Гутник, Н. В. Филинова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, ivan.kiel@gmail.com

Микробиом картофеля, как и у других высших растений, выполняет важные функции, поддерживая рост и развитие растений на всех этапах его жизни [Potato Microbiome ... , 2024]. Среди микроорганизмов, способных реагировать на неблагоприятные изменения в среде обитания и инициировать адаптивные реакции, особое место занимают актинобактерии рода *Rhodococcus*. За последнее десятилетие родококки привлекли значительный интерес благодаря своим высоким катаболическим свойствам.

Из ризосферы пырея ползучего (*Elymusrepens*), произрастающего на нефтезагрязненной почве, нами в 2010 г. был выделен штамм *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac-2784D. Было показано, что эти бактерии способны окислять как полиароматические углеводороды (ПАУ), так и алканы, что позволяет использовать этот штамм для биологической очистки почв [Possible pathways ... , 2017; Use of rhizosphere ... , 2020]. В то же время выделенный нами штамм является продуцентом биологически активных соединений с антимикробным действием, что подтверждается наличием генных кластеров синтеза вторичных метаболитов [Complete Genome ... , 2021], а также обладает способностью стимулировать рост растений за счет присутствия в супернатантах ауксинов [Tretyakova, 2019].

В работе использовали картофель сорта Луговской. 10 клубней (опыт) замачивали на сутки в суспензии клеток *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac – 2784D. Клубни контрольного варианта замачивали в стерильной водопроводной воде. Одновременно с посадкой клубней картофеля были взяты пробы исходной почвы для определения исходного микробного сообщества почвы. В дальнейшем прикорневая почва обрабатывалась суспензией клеток *Rhodococcus qingshengii* VKM Ac – 2784D на стадии цветения.

При обработке клубней картофеля *R. qingshengii* VKM Ac-2784D увеличилось количество клубней в кусте в 1,74 раза, по сравнению с контрольным вариантом, и общая масса урожая возросла на 55 %. Однако обработка не повлияла ни на среднюю массу (33–36 г), ни на средний размер клубня (44×30 мм). Количество поврежденных корнеплодов составило 12–14 % как в варианте с обработкой, так и в контрольном варианте.

Биоинформационный анализ ампликонов 38 образцов выполнен в рамках договора НИР с ИХБФМ СО РАН с использованием алгоритмов USEARCH/SINTAX по базе данных RDP 16S. Для каждой пробы определен таксономический состав (рис.).

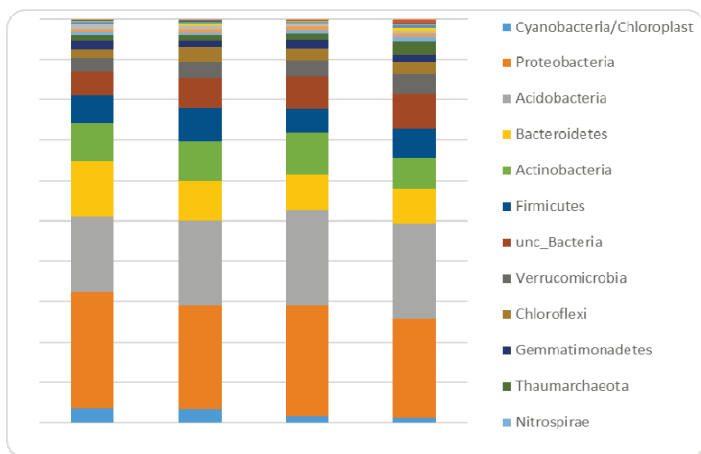


Рис. Таксономический состав микробиома ризосферы картофеля в контрольных и опытных образцах, собранных во время цветения и сбора урожая

В образцах почвы преобладали представители филумов Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria и Firmicutes. Предварительные данные указывают на то, что обработка суспензией клеток родококка привела к снижению содержания Proteobacteria и Bacteroidetes. Напротив, содержание Acidobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia возросло.

В результате исследования получены сведения о влиянии *R. qingshengii* VKM Ac-2784D на микробиом ризосферы картофеля. Негативного влияния на продуктивность растения не выявлено, ключевые группы (таксоны) микроорганизмов сохранились, хотя их представленность несколько изменилась.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-26-10049.

Литература

- Complete Genome Sequence of *Rhodococcus qingshengii* Strain VKM Ac-2784D, Isolated from *Elytorgia repens* Rhizosphere / I. S. Petrushin [et al.] // Microbiology Resource Announcements. 2021. Vol. 10, N 11. DOI: 10.1128/MRA. 00107–21
- Possible pathways for destruction of polyaromatic hydrocarbons by some oil-degrading bacteria isolated from plant endosphere and rhizosphere / L. A. Belovezhets [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. Vol. 53. P. 68–72. DOI: 10.1134/S0003683817010069
- Possible use of oil-degrading microorganisms for protection of plants growing under conditions of oil pollution / M. S. Tretyakova [et al.] // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2019. DOI: 10.1088/1755–1315/315/7/072046
- Potato Microbiome: Relationship with Environmental Factors and Approaches for Microbiome Modulation / I. S. Petrushin [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25. Art. 750. DOI: 10.3390/ijms25020750
- Use of rhizosphere microorganisms for bioremediation of oil contaminated soils / L. A. Belovezhets1, M. S. Tretyakova, Yu. A. Markova, A. A. Levchuk // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. Vol. 408. Art. 012086. DOI: 10.1088/1755-1315/408/1/012086

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПРОДУКТИВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ *HORDEUM VULGARE* L. ПРИ ДЕЙСТВИИ СУСПЕНЗИИ ШТАММА *PSEUDOMONAS* SP. GEOT18

И. И. Рассохина

Вологодский научный центр РАН, Вологда, rasskhinairina@mail.ru

Ячмень – важнейшая зерновая культура северо-запада России, в Вологодской области на долю посевных площадей ячменя приходится 17–19 % [Сельское хозяйство ...]. Актуальность производства ячменя обусловлена широкими возможностями его использования и адаптационными способностями культуры [Влияние агрометеорологических ... , 2022]. При этом реализация хозяйственно-значимыми растениями генетического потенциала в Нечерноземной зоне России ограничена переменчивыми погодными условиями [Морозов, 2011], в связи с этим в сельскохозяйственной практике широко применяют различные регуляторы роста и элементы питания. Одним из безопасных для окружающей среды и перспективным путем повышения продуктивности культур является использование PGPR микроорганизмов [Максимов, Абизгильдина, Пусенкова, 2011].

Цель исследования – оценить морфофизиологические и продуктивные параметры *Hordeum vulgare* L. при действии суспензии штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18.

Исследования действия суспензии штамма на параметры *H. vulgare* сорта Сонет проводили при постановке мелкоделяночных полевых опытов на поле ВолНЦ РАН в течение вегетационных сезонов 2020 и 2022 гг. Площадь учетной делянки составляла 2 кв. м, повторность опыта – трехкратная. Уход за посевами осуществляли вручную, дополнительные минеральные удобрения, гербициды и пестициды не вносили.

Бактерии *Pseudomonas* sp. GEOT18, суспензия которых использована в исследованиях, выделены из внутренних тканей стеблекорневых тубероидов генеративных особей *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó в лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова. Штамм идентифицирован с помощью молекулярно-генетического анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, а полученная последовательность депонирована в базу данных GenBank (номер – MT180656). Суспензию штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 получали на среде LB в условиях постоянного перемешивания при температуре 24 °С в течение 16–18 ч. Обработку растений суспензией штамма проводили дважды: перед посевом (инокуляция семян в течение 30 мин) и в фазу кушения (опрыскивание филлосферы до появления капель мелкодисперсной росы). Для обработки растений в контрольном варианте по той же схеме использовали воду.

В течение исследования проводили оценку морфофизиологических параметров растений опытной и контрольной групп, в т. ч. среднюю пло-

щадь одного листа и ассимиляционную поверхность растения, сырую и сухую массу, а также содержание фотосинтетических пигментов. В фазу начала восковой спелости оценивали зерновую продуктивность опытных и контрольных растений. Статистическую обработку данных осуществляли по стандартным методикам с использованием пакета анализа данных программы MS Excel'2019, доверительная вероятность – 0,95.

В результате исследований установлено, что в фазе колошения различия в опыте 2020 г. находились в пределах статистической погрешности, в 2022 г. наблюдалось превосходство опытных вариантов над контрольными по массе на 42–81 %. В стадию колошения в оба года исследования суспензия штамма способствовала большему накоплению сырой и сухой массы ячменя на 45–93 % и 29–96 % соответственно. Важным ростовым параметром является площадь ассимиляционной поверхности растения, которая аналогично сухой массе в опытном варианте превосходила контрольные значения до 19–95 % (табл.).

Таблица

Краткие результаты оценки морфометрических параметров *H. vulgare*

Показатель	Опыт 2020 г.		Опыт 2022 г.	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>кущение</i>				
Площадь одного листа, см ²	3,1±0,16	2,9±0,11	3,1±0,19	5,2±0,22
Площадь всех листьев растения, см ²	17,5±0,27	17,7±1,16	21,8±1,40	38,3±1,94
Сырая масса, г	0,70±0,024	0,68±0,023	0,91±0,08	1,65±0,10
Сухая масса, г	0,159±0,001	0,150±0,001	0,297±0,021	0,423±0,024
<i>колошение</i>				
Площадь одного листа, см ²	3,4±0,18	4,3±0,20	3,9±0,12	5,9±0,13
Площадь всех листьев растения, см ²	27,3±2,03	33,0±2,30	33,3±0,93	53,2±0,99
Сырая масса, г	1,20±0,08	1,74±0,20	1,20±0,10	2,31±0,16
Сухая масса, г	0,352±0,039	0,453±0,054	0,453±0,038	0,888±0,067

Также в листьях *H. vulgare* сорта Сонет после обработки суспензией штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 содержание фотосинтетических пигментов в фазу кущения превзошло контроль на 55–57 %, в фазу колошения – на 16–33 %, в фазу цветения – на 25–41 %.

Вероятно, большая ассимиляционная поверхность с большим содержанием фотосинтетических пигментов и способствовала более интенсивному накоплению сухого вещества в течение вегетации. В результате опыта 2020 г. зерновая продуктивность ячменя при действии суспензии штамма возросла на 20 %, в опыте 2022 г. – на 40 %.

Наиболее благоприятным для роста растений *H. vulgare* сорта Сонет и бактерий штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 оказались условия вегетационного периода 2022 г., который выдался более теплым по сравнению с 2020 г.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии штамма *Pseudomonas* sp. GEOT18 на морфофизиологические и продуктивные показатели *Hordeum vulgare* L. сорта Сонет в условиях Вологодской области.

Литература

Влияние агрометеорологических изменений климата на зерновую продуктивность ярового ячменя в условиях Нечерноземной зоны РФ / О. В. Левакова, И. А. Дедушев, Л. М. Ерошенко [и др.] // Юг России: экология, развитие. 2022. № 17 (62). С. 128–135. DOI: 10.18470/1992-1098-2022-1-128-135

Максимов И. В., Абизгильдина Р. Р., Пусенкова Л. И. Стимулирующие рост растений микроорганизмы как альтернатива химическим средствам защиты от патогенов // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47, № 4. С. 373–385.

Морозов А. И. Влияние регулятора роста Циркон на адаптивность сортов мяты перечной к нестабильным погодным условиям Нечерноземной зоны России // Плодоводство и ягодоводство России. 2011, Т. 28. № 2. С. 83–89.

Сельское хозяйство, охота и лесное хозяйство // Федеральная служба государственной статистики. 1999–2022. URL: <https://vologdatastat.gks.ru/sel'skoe%20hozyajstvo> (дата обращения: 10.05.2022).

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ *TOO MUCH LOVE* В РАЗВИТИИ КЛУБЕНЬКОВ У ЛЮЦЕРНЫ

Д. Н. Рубцова, М. А. Лебедева, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербург, daria.rubtsova2016@yandex.ru

Бобовые растения могут вступать в симбиоз с почвенными бактериями ризобиями, в результате чего на корнях бобовых растений формируются новые органы – симбиотические клубеньки, в которых происходит процесс азотфиксации. Формирование азотфиксирующих клубеньков контролируется растением. Ключевую роль в этом процессе играют мобильные регуляторные пептиды CLE, образующиеся в корнях, и их рецепторы – CLV1-подобные киназы, работающие в побеге. Связывание пептидов CLE с их рецепторами вызывает ответный сигнал, подавляющий развитие симбиотических клубеньков на корнях с участием регуляторных молекул, транспортирующихся из побега в корень. У люцерны *Medicago truncatula* в ответ на активацию рецепторов CLE происходит увеличение содержания транскриптов генов *MtTML1* и *MtTML2* (*TOO MUCH LOVE* 1 и 2) в корнях, что приводит к подавлению развития симбиотических клубеньков [Unraveling new ... , 2019; Local and systemic ... , 2023]. Мутация в гене *TML* у лядвенца японского приводит к избыточному клубенькообразованию [TOO MUCH LOVE, a root ... , 2009; TOO MUCH LOVE, a novel ... , 2013]. Гены *TML1,2* кодируют F-box белки с Kelch-повторами, которые, вероятно, функционируют в роли E3-убиквитин-лигаз. Предполагается, что белок *TML*, компонент убикви-

тин-лигазного комплекса, может быть вовлечён в подавление клубенькообразования за счёт убиквитин-зависимой деградации белков – ключевых регуляторов развития симбиоза [TOO MUCH LOVE, a novel ... , 2013]. Однако конкретные мишени белков TML и механизмы их действия остаются не изученными. Для исследования роли генов *TML* в контроле развития клубеньков у люцерны нами были созданы конструкции для получения нокаутов по генам *MtTML1* и *MtTML2* с помощью CRISPR-Cas9-опосредованного геномного редактирования. К настоящему времени в результате агробактериальной трансформации с помощью созданных конструкций нами получены растения-регенеранты, анализ ДНК которых позволил выявить события редактирования в изучаемых генах. В частности, нами было получено растение поколения T0, у которого обе аллели гена *MtTML2* оказались отредактированы: одна аллель содержит делецию одного нуклеотида (del-1), а другая аллель содержит делецию 72 нуклеотидов (del-72)

Кроме того, нами были созданы конструкции для сверхэкспрессии этих генов *MtTML* под контролем конститутивного промотора CaMV 35S. Изучение растений с изменением активности генов *MtTML1* и *MtTML2*, в частности, проведение транскриптомного анализа корней таких растений, позволит понять механизм действия генов *MtTML1* и *MtTML2* в подавлении программы симбиоза.

Литература

Local and systemic targets of the MtCLE35-SUNN pathway in the roots of *Medicago truncatula* / M. A. Lebedeva, D. A. Dobyckina, Y. S. Yashenkova [et al.] // J Plant Physiol. 2023. Vol. 281. Art. 153922. DOI: 10.1016/j.jplph.2023.153922

TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume–rhizobium symbiosis / M. Takahara, S. Magori, T. Soyano [et al.] // Plant Cell Physiol. 2013. Vol. 54. Art. 433. DOI: 10.1093/pcp/pct022

TOO MUCH LOVE, a root regulator associated with the long-distance control of nodulation in *Lotus japonicas* / S. Magori, E. Oka-Kira, S. Shibata [et al.] // Mol. Plant. Microbe Interact. 2009. Vol. 22, N 3. Art. 259–68. DOI: 10.1094/MPMI-22-3-0259

Unraveling new molecular players involved in the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula* / P. Gautrat, V. Mortier, C. Laffont [et al.] // J Exp Bot. 2019. Vol. 70, N 4. P. 1407–1417. DOI: 10.1093/jxb/ery465.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА АБИОПЕПТИД® И КОЛОНИЗАЦИИ АССОЦИАТИВНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ НА РОСТ РАСТЕНИЙ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К СТРЕССАМ

Е. Б. Рукавцова¹, Н. С. Захарченко¹, А. Н. Шмарев²,
В. Д. Креславский², А. Н. Звонарев³, И. Ф. Пунтус³, А. Е. Филонов³,
А. В. Ариповский⁴

¹Филиал ГНЦ РФ Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пущино, ruk@bibch.ru

²Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина, Пущино

⁴Научно-производственная компания «А-БИО», Пущино

В современном сельском хозяйстве для увеличения урожая в последние годы применяются такие стимуляторы роста растений, как белковые гидролизаты (БГ) или смесь аминокислот, которые производятся из источников белка с использованием частичного гидролиза. Показано, что корни растений усваивают БГ всего на 6–25 %, а остальная часть захватывается почвенными микроорганизмами. Механизм действия БГ изучен недостаточно полно. БГ могут играть важную роль в качестве сигнальных соединений, что приводит к морфофизиологическим и биохимическим изменениям в растениях.

Перспективным методом повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам является применение микробных технологий, таких как колонизация полезными микроорганизмами PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Показано, что колонизация различными штаммами PGPR приводила к улучшению физиологических характеристик растений и более эффективной их адаптации к условиям роста *in vivo*.

На базе НПК «А-БИО» (Московская обл., г. Пущино) производится препарат Абиопептид®, представляющий собой ферментативный гидролизат соевого белка. В настоящее время этот препарат используется в качестве биологически активной добавки к пище и источника аминокислот в ветеринарии. Поскольку применение БГ в сельском хозяйстве может опосредованно влиять на полезные микроорганизмы, ассоциированные с растениями, целью нашей работы было исследование влияния Абиопептида® на фотосинтетическую активность, рост и развитие растений горчицы сарептской *Brassica juncea* L., в сочетании с колонизацией полезными микроорганизмами *Pseudomonas putida* КТ2442 и *Rhodococcus erythropolis* X5.

Нами показаны изменения в росте и развитии растений *B. juncea* L. *in vitro* и *in vivo*, содержании жирных кислот (ЖК) в семенах. Проанализирована активность фотосинтетического аппарата в нормальных и стрессовых условиях (4 ч нагревание при 40 °С или 4 ч обработка светом высокой интенсивности (СВИ), 1000 мкмоль квантов/м²с). Показано, что количе-

ство исследуемых микроорганизмов в корнях растений *in vitro*, обработанных Абиопептидом®, оказалось выше, чем в корнях контрольных растений. Обнаружено, что неколонизированные растения, выращенные с Абиопептидом®, обладают повышенной устойчивостью к абиотическим стрессовым факторам, таким как повышенная температура или СВЧ, а колонизированные *R. erythropolis* X5 – к повышенной температуре. Колонизированные этими бактериями растения, обработанные Абиопептидом®, в условиях закрытого грунта зацветали на неделю раньше и отличались повышенной средней массой семян. Семена обработанных Абиопептидом® колонизированных растений содержали больше ненасыщенных ЖК, таких как линолевая, α -линоленовая и олеиновая кислоты, по сравнению с контрольными, не обработанными, растениями. Полученные данные свидетельствуют о том, что при использовании в сельском хозяйстве Абиопептида®, он может оказывать стимулирующее действие на растения, увеличивая среднюю массу зерна, содержание ненасыщенных ЖК и устойчивость фотосинтетического аппарата к высокой температуре и свету высокой интенсивности.

НОВЫЕ ШТАММЫ РОДА *PSEUDOMONAS*, ОБЛАДАЮЩИЕ СПОСОБНОСТЬЮ МЕТАБОЛИЗИРОВАТЬ АБК И АКТИВИРОВАТЬ РОСТ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ

**А. С. Рябова, Л. Ю. Кузьмина, Е. А. Гильванова,
Е. В. Мартыненко, Л. Б. Высоцкая**

Уфимский институт биологии Уфимского ФИЦ РАН, Уфа
alenarya@rambler.ru

В посевах сельскохозяйственных культур при воздействии неблагоприятных условий, в том числе и при загущенной посадке, происходит накопление абсцизовой кислоты (АБК) в растениях и в почве, что приводит к подавлению роста растений и снижению урожайности. Одним из методов регуляции содержания абсцизовой кислоты в растениях при умеренных стрессах могло бы быть использование биопрепаратов, содержащих АБК-деградирующие бактерии. В настоящее время количество выявленных микроорганизмов, способных метаболизировать АБК, также, как и знания о них остаются весьма ограниченными.

В проведенных нами исследованиях АБК-разрушающая способность и ростстимулирующая активность была обнаружена у новых штаммов рода *Pseudomonas*: *P. veronii* IB K11–1 (UIB-255, PP237770), *P. frederiksbergensis* IB Ta10m (UIB-256, PP316701) и *Pseudomonas* sp. IB TaE2 (UIB-257, PP316703). Штаммы были выделены из грунта пещер Киндерлинская (*P. veronii*) и Таврида (*P. frederiksbergensis* и *Pseudomonas* sp.). При культивировании бактерий в течение 14 сут. на минерально-солевой среде с

абсцизовой кислотой потребление АБК у разных штаммов варьировало от 25 до 68 %, при этом увеличение численности клеток было одного порядка в 200–300 раз. В лабораторном опыте при внесении в ризосферу растений пшеницы бактериальной суспензии (10^8 КОЕ/г субстрата) через 10 сут. после обработки ростстимулирующее действие наиболее заметно проявлялось для штаммов *P. frederiksbergensis* IB Ta10m и *P. veronii* IB K11-1, которые увеличивали массу растений пшеницы и достоверно снижали уровень АБК. Тогда как влияние штамма IB TaE2 на рост растений было статистически недостоверно.

Таким образом, новые штаммы *Pseudomonas*, обладающие АБК-деградирующей и ростстимулирующей способностью, могут быть перспективными для изучения механизмов их влияния на растения с целью создания биопрепаратов, повышающих устойчивость растений к умеренным биотическим и абиотическим неблагоприятным воздействиям.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-26-00104 «Влияние бактерий, способных катаболизировать абсцизовую кислоту, на рост растений в загущенных посевах».

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *COLLETOTRICHUM LINI* РАЗЛИЧНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ЛЬНА

Е. А. Сигова¹, Е. М. Дворянинова¹, Е. Н. Пушкова¹,
Д. А. Жернова¹, А. М. Каплун^{1,2}, В. А. Павлова^{1,3}, Т. А. Рожмина⁴,
Н. В. Мельникова¹, А. А. Дмитриев¹

¹Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН
Москва, sigova.ea@phystech.edu

²Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Москва

³Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова
МИРЭА – Российский технологический университет, Москва

⁴Федеральный научный центр лубяных культур, Торжок

Одно из наиболее часто встречающихся и наносящих значительный ущерб льноводству заболеваний – антракноз. Возбудителем антракноза является грибной патоген *Colletotrichum lini*. При заражении антракнозом взрослые растения льна увядают и погибают, а оставшиеся семена обладают плохой всхожестью. Важной задачей является понимание механизмов вирулентности фитопатогена, что ускорит разработку новых эффективных методов борьбы с антракнозом, а также будет способствовать созданию устойчивых сортов льна. Целью работы является установление молекулярных механизмов вирулентности фитопатогена *C. lini* посредством транскриптомного анализа штаммов различной степени вирулентности при заражении растений льна.

Для достижения поставленной цели создана коллекция из 20 штаммов *S. lini* различной степени вирулентности. Все выбранные штаммы охарактеризованы по культурально-морфологическим признакам и степени вирулентности. При заражении использовали 2 сорта льна – устойчивый Леона и восприимчивый Пенджаб. Так как наибольшее проявление заражения антракнозом выявляется на корнях, для выделения РНК нами выбраны именно корни зараженных растений. Для определения наиболее подходящей для исследования стадии сбора материала, проводили тесты по выращиванию и заражению проростков льна на разных стадиях их развития. Также протестированы различные условия выращивания. Оптимальным оказалось проращивание семян в рулонах фильтровальной бумаги без грунта. Далее проводили отбор проростков одинакового размера и заражали их суспензией спор. Первые симптомы заражения наблюдались через 20–24 ч. На 4–5 день после заражения растения погибали. Исходя из проведенных экспериментов выбраны точки сбора – 1-й, 2-й и 3-й дни после заражения.

Выделение РНК проводили ЦТАБ-методом из замороженных корней. В результате секвенирования библиотек кДНК на платформе Illumina выяснили, что транскриптомные чтения гриба составляют 5–10 % от всех данных секвенирования. Для картирования транскриптомных данных использовали полученные нами ранее высококачественные сборки геномов штаммов, которыми проводили заражение.

Анализ дифференциальной экспрессии генов является основой для изучения эффекторных белков, участвующих в молекулярно-генетических процессах заражения. Сравнение транскриптомных данных гриба, поражающего корни льна, и находящегося в контрольных условиях (грибной мицелий) позволит выявить гены, участвующие в процессе заражения. Сравнение экспрессии генов на разных стадиях развития болезни при заражении различными по степени вирулентности штаммами приблизит нас к пониманию молекулярных механизмов вирулентности фитопатогена *S. lini*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-16-00169, <https://rscf.ru/project/22-16-00169/>.

ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ОБВОДНЁННЫХ ПОРОД В КОМБИНАЦИИ С ПРОТРАВИТЕЛЕМ СЕМЯН ПРОТЕГО МАКС НА УРОЖАЙНОСТЬ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

А. М. Субботин, В. Н. Тимофеев

Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, fic@tmnsc.ru

Повышение урожайности, адаптивных свойств и совершенствование технологии выращивания зерновых культур является важной задачей современного растениеводства. Одним из экологически безопасных и наиболее перспективных направлений, развиваемых в настоящее время, считается применение биологически активных препаратов на основе почвенных микроорганизмов [Azizbekyan, 2019]. При этом необходимо учитывать как почвенно-климатические компоненты при интродукции микроорганизмов, так и их взаимодействие с ризосферой растений в конкретных условиях растениеводства. В то же время важно рассматривать их сочетание с основными элементами защиты растений, применяемых в агрономии.

В данном исследовании изучалась эффективность биопрепаратов на основе бактерий, выделенных из многолетнемёрзлых обводнённых пород Западной и Восточной Сибири. В работе использовались 4 штамма бактерий рода *Bacillus*: 875-TS *Bacillus cereus*, 9-08-CH9 *Bacillus cereus*, 2-06-TS1 *Bacillus megaterium*, Мм8 род *Bacillus (Bacillus sp.)* и 1 штамм рода *Achromobacter*: 10-50-TS2 *Achromobacter spanius* из Коллекции почвенных микроорганизмов многолетнемёрзлых пород Арктики (ПМММПА) ТюмНЦ СО РАН. Культуры бактерий для инокуляции семян применялись в виде бинарных смесей с рабочей концентрацией каждого штамма 10^7 – 10^8 бактериальных клеток в 1 мл воды. Штаммы бактерий и бактериальные миксы (БМ) прошли предварительные лабораторные испытания по влиянию на морфофизиологические параметры растений, в которых были получены положительные результаты [Влияние микроорганизмов ... , 2016]. Протравитель семян Протега Макс МЭ (ПМ) – трех компонентный химический протравитель (пираклостробин, 25 г/л, протиоконазол, 75 г/л, тебуконазол, 25 г/л) использовали в рабочей концентрации (расход 0,8 л/т). ПМ обладает свойствами фунгицида, пестицида и регулятора роста растений. Семена яровой пшеницы сорт Авиада, предварительно обработанных ПМ, непосредственно перед посевом импрегнировали в поле миксами штаммов бактерий (БМ) из расчёта 20л. бактериальной смеси на 1 тонну семян.

Определяли влияния обработки семян протравителем Протега Макс МЭ, и сочетания обработки семян протравителем ПМ с инокуляцией семян бинарными смесями бактериальных культур на энергию прорастания (ЭП) и всхожесть семян (ВС) яровой пшеницы, развитие в начальные фазы роста растений, поражение их корневыми гнилями, продуктивность и

урожайность. Исследования выполнены в соответствии с руководствами и методиками государственного сортоиспытания (1983), проведения полевых опытов (1971), методическими рекомендациями по селекции и семеноводству (1978).

Полевые исследования проведены на опытном поле НИИСХ Северного Зауралья – филиал ТюмНЦ СО РАН, зона Северная Лесостепь, Тюменская область, п. Московский. Вегетационный период 2021 г. можно охарактеризовать, как недостаточно обеспеченный осадками – 39,6 % от нормы; хорошо обеспеченный теплом при превышении среднегодовых температур на 20 %.

Обозначения вариантов исследования: К1-контроль без обработки семян; К2-контроль с протравливанием семян протравителем ПМ; 3 – ПМ+БМ 875-TS x 9-08-СН9; 4 – ПМ+БМ 875-TS x 2-06-TS1; 5 – ПМ+БМ 875-TS x Мм8; 6 – ПМ+БМ 9–08-СН9 x 2-06-TS1; 7 – ПМ+БМ 9-08-СН9 x Мм8; 8 – ПМ+БМ 10-50-TS2 x Мм8.

Анализ влияния на ЭП и ВС применяемых для обработки семян препаратов, проведенный методом закладки в увлажнённые бумажные рулоны показал, что импрегнация БМ без протравливания семян ПМ не влияли на энергию и всхожесть. Статистически значимых различий между вариантами опыта и интактным контролем не установлено. На фоне химического протравливания ПМ в сочетании с импрегнацией БМ выявляется статистически значимое по сравнению с интактным контролем возращание ЭП в вариантах 4,6,7 от 10 до 18 % и увеличение ВС в вариантах 6,7,8 до 10 %.

При анализе развития зародышевых органов установлено, что обработка семян БМ в сочетании с ПМ не оказывало статистически значимого влияния на развитие корневой системы. Длина coleoptилей и масса ростков во всех вариантах статистически значимо снижалась по сравнению с контролем К1.

Комплексное применение БМ+ПМ показало достаточно высокую эффективность против корневых гнилей в фазу кущения от 71 % до 100 %. Отмечаются варианты 4, 6, в которых наблюдалось значительное снижение эффективности к концу вегетации до 41–56 %. В остальных вариантах – 3,5,7,8 эффективность перед уборкой составляла от 69 до 79 % при 86 % в контроле К2 с обработкой семян только ПМ.

При анализе показателей структуры растений регистрируется увеличение длины колоса (варианты 3, 5, 7), количества колосков (варианты 3, 7), количества зёрен (варианты 3, 5, 7), вес зерна с 25 стеблей (варианты 3, 5), вес зерна с 1м² (варианты 5, 7, К2), масса 1000 зёрен/гр. (варианты 5, 7) по сравнению с контролем К2 с обработкой семян только ПМ. Урожайность культуры пшеницы по всем вариантам опыта составляла от 2,5 до 2,89 т/га. Увеличение урожайности на 11,8 % (0,3т/га), 14,2 % (0,35т/га), 12,6 % (0,31т/га) по сравнению с контролем К1 регистрировалось в вари-

антах 3,5,7 соответственно. Протравливание семян только ПМ (К2) увеличило урожайность на 9 % (0,22т/га).

Качество зерна оценивалось как высокое. Содержание белка составляло 12,5–14,2 %, натура 740 г/л, содержание клейковины 26–29 % с хорошим ее качеством, без четкого влияния применяемых элементов технологии.

В итоге в условиях опыта при испытании миксов бактериальных штаммов в системе предпосевного протравливания семян яровой пшеницы ПМ наиболее положительное влияние на урожайность культуры оказали варианты 3 – (ПМ + БМ 875 х 908), 5 – (ПМ + БМ 875 х Мм8), 7 – (ПМ + БМ 908 х Мм8). Повышение урожайности в этих вариантах составило в среднем 0,32т/га.

Работа выполнена согласно Государственному заданию на 2021–2030 годы. «Пространственно-временные явления и процессы, происходящие в водах суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата» (Приоритетное направление 1.5.11. Программа 1.5.11.1).

Литература

Влияние микроорганизмов из многолетнемерзлых пород на морфофизиологические показатели яровой пшеницы / А. М. Субботин, М. В. Нарушко, Н. А. Боме [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016. № 20 (5). С. 666–672.

Azizbekyan R. R. Biological Preparations for the Protection of Agricultural Plants (Review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. Vol. 55, N 8. P. 816–823. DOI: 10.1134/S0003683819080027

РОЛЬ SVX-МЕТАЛЛОПРОТЕАЗ В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ, ИНДУЦИРУЕМЫХ ФИТОПАТОГЕННЫМИ ПЕКТОЛИТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ

**Н. В. Тендюк¹, А. А. Дьяконова^{1,2}, О. Е. Петрова¹,
Т. А. Мухаметзянов², О. Н. Макшакова¹, В. Ю. Горшков^{1,2}**

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, natalya.tendyuk@mail.ru, diakonova27@mail.ru, poe60@mail.ru olga.makshakova@kibb.knc.ru, vladimir.gorshkov@kibb.knc.ru

²Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань timur.mukhametzyanov@kpfu.ru

В арсенале фитопатогенных пектолитических бактерий *Pectobacterium* и *Dickeya* – возбудителей мягких гнилей растений – помимо экстраклеточных полисахарид-деградирующих ферментов есть и другие детерминанты патогенности, и конкретные функции некоторых из них остаются неизвестными. К таким факторам вирулентности относится Svх-подобные белки. До наших исследований было известно, что белок Svх является фактором вирулентности пектобактерий, экспрессия гена *svx* *Pectobacterium atrosepticum* индуцируется в условиях *in planta* [Transcrip-

to me profiling ... , 2018], а сам белок секретируется бактериями в клеточную стенку растения-хозяина [Identification of a new ... , 2005]. Однако то, какие функции выполняют белки Svx пектобактерий и дикей оставалось совершенно неизвестным. Более того, этот вопрос вызывает дополнительный интерес ввиду того, что у некоторых видов рода *Dickeya* в геномах присутствует сразу два гена, кодирующих Svx-подобные белки, в то время как у пектобактерий этот ген в геноме всегда присутствует в единственном экземпляре. Чтобы понять, какую роль играют белки Svx в развитии инфекционных процессов, вызываемых пектолитическими бактериями, мы проанализировали профили экспрессии генов, кодирующих данные белки у *Dickeya solani*, а также сравнили структурные характеристики, каталитические и фитоиммунные свойства белка Svx *Pectobacterium atrosepticum* и двух Svx-гомологов *Dickeya solani* (Svx44 и Svx45).

В условиях *in planta* уровень экспрессии гена *svx44 D. solani* (так же как и гена *svx P. atrosepticum*) увеличивался в десятки раз по сравнению с условиями *in vitro*, в то время как ген *svx45* экспрессировался конститутивно. В результате биоинформатического анализа нами показано, что белок Svx *P. atrosepticum* и белки-гомологи Svx44 и Svx45 *D. solani* обладают схожими третичными структурами и имеют протеазные и ацилтрансферазо-подобные домены, которые взаимодействуют между собой за счет гидрофобных связей, формируя отрицательно-заряженные карманы, в которых расположены активные центры протеазных доменов, образованные цинк-связывающими мотивами и углевод-связывающими аминокислотными остатками. У очищенных препаратов белков гомологов Svx44 и Svx45 *D. solani*, так же как у белка Svx *P. atrosepticum* выявлена протеазная активность, которая увеличивалась при добавлении ионов цинка и ингибировалась в присутствии ЭДТА, что свидетельствует о том, что все три белка являются активными цинк-зависимыми металлопротеазами.

В результате докинга модели белка Svx *P. atrosepticum* с предполагаемыми лигандами, нами обнаружено, что белки Svx пектолитических бактерий способны взаимодействовать с экстенсинами – структурными альфа-гликозилированными белками растительной клеточной стенки. Расположение активных центров протеазных доменов Svx белков в отрицательно-заряженных карманах дополнительно подтверждает данную теорию, поскольку экстенсины являются положительно-заряженными белками.

Для того чтобы сравнить фитоиммунные свойства белков Svx *D. solani* и *P. atrosepticum*, очищенные препараты рекомбинантных белков инфильтрировали в листья табака. Инфильтрация белков Svx44 и Svx45 *D. solani*, так же как и белка Svx *P. atrosepticum*, препятствовала накоплению перекиси водорода в листьях растений в ответ на действие элиситора хитооктаозы, что свидетельствует о наличии у данных белков иммуносупрессорных свойств. Более того, инфильтрация белков Svx44 и Svx45 *D. solani*, так же, как и белка Svx *P. atrosepticum*, индуцировала экспрессию этилен-регулируемых генов, кодирующих фактор транскрип-

ции (ERF1) и фермент биосинтеза этилена (ACO1). Ни один из белков Svх не активировал экспрессию салицилат-индуцируемого гена PR-1 и гена фермента пути синтеза жасмоновой кислоты – алленоксидциклазы (АОС). Однако белки Svх *P. atrosepticum* и Svх45 *D. solani* индуцировали экспрессию гена липоксигеназы (LOX2), что может быть связано с активацией других ветвей липоксигеназного каскада, не связанных с синтезом жасмонатов.

Таким образом, можно сделать вывод, что белки Svх пектолитических бактерий *Pectobacterium* и *Dickeya* достаточно консервативны. Они являются активными цинк-зависимыми металлопротеазами, которые, вероятно, разрушают структурные белки растительной клеточной стенки – экстенсины. Данные протеазы также обладают иммуносупрессорными свойствами и являются индукторами этилен-опосредуемых ответов растений, которые, как показано ранее, способствуют развитию инфекций, вызываемых дикейями и пектобактериями (рис.). При этом стоит отметить, что металлопротеазы Svх *D. solani*, вероятно, играют разную роль в развитии инфекционного процесса, поскольку кодирующие их гены по-разному экспрессируются в условиях *in planta*, а сами белки дифференциально индуцируют экспрессию гена липоксигеназы.

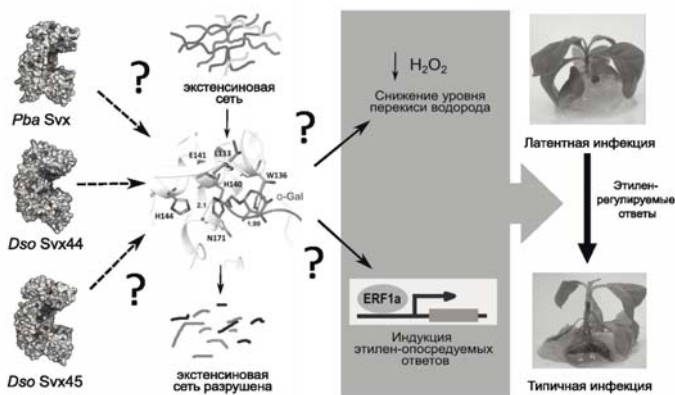


Рис. Схема предполагаемого механизма действия Svх-протеаз, отражающая их роль в развитии инфекций, индуцируемых пектолитическими бактериями

Литература

Identification of a new quorum-sensing-controlled virulence factor in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* secreted via the type II targeting system / M. Corbett, S. Virtue, K. Bell [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. 2005. Vol. 18. P. 334–342.

Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants / V. Gorshkov, R. Gubaev, O. Petrova [et al.] // European Journal of Plant Pathology. 2018. Vol. 152. P. 957–976.

СИМПТОМЫ ПРОЯВЛЕНИЯ И ВРЕДНОСНОСТЬ ШЕРСТИСТОЙ МЯГКОЙ ГНИЛИ (*RHIZOPUS STOLONIFER*) КОРНЕПЛОДОВ МОРКОВИ СТОЛОВОЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Т. О. Тихонова, Е. Г. Козарь, И. А. Енгальчева, В. А. Степанов

Федеральный научный центр овощеводства, Одинцово

tikhonova@tatyana94.ru

Значительную угрозу для сельскохозяйственной продукции после сбора урожая могут представлять сапротрофные теплолюбивые зигомицеты рода *Rhizopus* spp. (Enrenb.) [Пидопличко, Милько, 1971]. Разные виды *Rhizopus* различаются по скорости развития, но температурный оптимум у всех составляет 25–35°C, а при температуре ниже 10°C рост прекращается. Вид *Rhizopus stolonifer* относится к отделу Zygomycetes, классу Mucorales, семейству Mucogaceae, роду *Rhizopus* и является одним из самых распространенных быстрорастущих во влажной среде видов [The *Rhizopus stolonifer*-Tomato ... , 2008]. Споры *R. stolonifer* долго сохраняются в почве и могут распространяться воздушно-капельным путем, что приводит к высоким потерям широкого спектра овощной продукции и наиболее вредоносен на луковых и пасленовых культурах [Bautista-Banos, Bosquez-Molina, Barrera-Necha, 2014]. На моркови столовой он вызывает шерстистую мягкую гниль (*R. stolonifer*) и относится к болезням хранения, которая встречается и наносит большой ущерб в Северной Америке, Южной Европе и Индии. В условиях средней полосы России встречается не часто и в естественных условиях хранения при температуре 2–4 °C симптомы поражения корнеплодов этим возбудителем практически не проявляются. Проблемы начинаются при изменении режима хранения в процессе подготовки маточных корнеплодов к высадке. Наиболее опасно заражение *R. stolonifer*, которое носит характер скрытой внутренней инфекции и наиболее наглядно проявляется при иммунологической оценке в условиях *in vitro* (рис.). Поражение корнеплодов, и особенно головки, в результате приводит к выпадам семенных растений. Это представляет серьезную проблему для селекции и семеноводства этой культуры.

На дисках корнеплодов симптомы внутреннего заражения *R. stolonifer* проявляется уже на вторые сутки в виде небольших светлорыжих влажных участков, которые быстро увеличиваются в размере, размягчаются, после чего начинается интенсивный рост воздушного мицелия. Скорость его радиального роста в первые двое суток может достигать 25–30 мм в сутки в зависимости от температуры. Дальнейшее распространение мицелия по соседним дискам корнеплодов несколько замедляется и в среднем за четверо суток скорость составляет 10–15 мм в сутки. При наличии нескольких источников инфекции в контейнере, возбудитель может заполнить всю его площадь (1050 см²) уже на 5–7-е сут., после раскладки корнеплодов, образуя грубый белый плотный мицелий и

черные спорангии (рис.). Следует отметить, что даже удаление зараженных дисков (источников инфекции) не всегда предотвращает распространение на другие корнеплоды. В результате чего становится невозможно провести объективную оценку селекционного материала моркови на устойчивость к другим фитопатогенам при иммунологическом анализе в условиях *in vitro*.

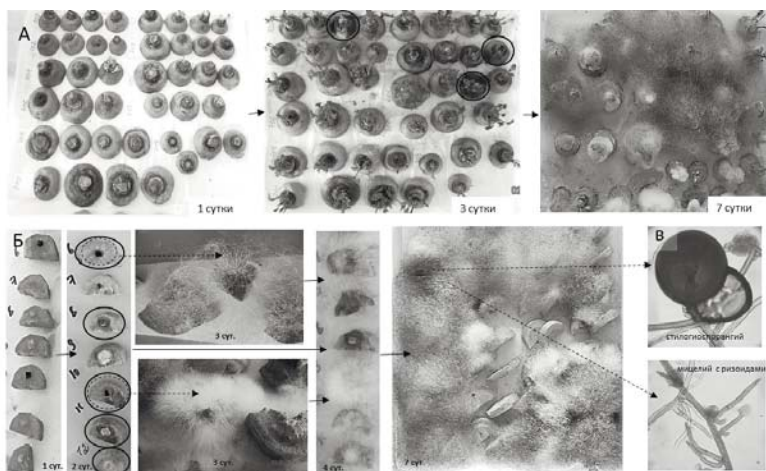


Рис. Симптомы поражения и динамика распространения *R. stolonifer* на головках (А) и дисках (В) корнеплодов на 1–2(3)–7 сут. в условиях *in vitro*; микроструктуры возбудителя (В). Корнеплоды с внутренней инфекцией (источники) обведены черным контуром (2–3 сут.)

Применение методов поверхностной стерилизации корнеплодов перед проведением анализа, такие как, промывание корнеплодов в проточной воде с моющими средствами, протирание спиртом, фломбирование, как отдельно, так и в совокупности не всегда дает положительные результаты и не позволяет избавиться от латентной инфекции. Наши исследования показали, что наиболее оптимальным способом стерилизации корнеплодов перед проведением анализа, для снижения вероятности развития шерстистой мягкой гнилью следует сначала промывать корнеплоды моющими средствами, затем замочить их в 5 % растворе гипохлорита натрия, с тщательной дальнейшей промывкой дистиллированной водой.

После этого корнеплоды раскладывают на стерильную фильтровальную бумагу, подсушивают, помещают в чистые пластиковые контейнеры (обработанные спиртом) и хранят при температуре ниже 10 °С до проведения анализа. Но даже в данном случае, отсутствует гарантия исключения дисков корнеплодов с внутренней инфекцией, процент которых в зависимости от образца может составлять 3–10 %. Снижению скорости рас-

пространения мицелия *R. stolonifer* также способствует: своевременное удаление зараженных дисков при появлении первых симптомов в виде мокнущих пятен, обработка спиртом места их расположения, отсутствие влажной подложки под дисками в виде фильтровальной бумаги и по возможности проведение иммунологической оценки в зависимости от биологических особенностей фитопатогенов при температурах ниже 25 °С (20–22 °С).

Таким образом, в связи с глобальным потеплением климата отмечается быстрое распространение теплолюбивых фитопатогенов в более северные регионы нашей страны и значимой становится проблема возрастания вредоносности шерстистой мягкой гнили (*R. stolonifer*) корнеплодов моркови. Наибольшее распространение этого возбудителя отмечается в годы при повышенных температурах и влажности в период уборки корнеплодов. Поэтому все острее встает вопрос изучения биологии этого возбудителя и его взаимоотношений с растением-хозяином в патосистеме в зависимости от погодных условий региона выращивания; механизмов иммунного ответа и поиск источников устойчивости к нему; оптимизация в связи с этим современных методов защиты.

Литература

Пидопличко Н. М., Милько А. А. Атлас мукоральных грибов. Киев : Наукова думка, 1971. 116 с.

The Rhizopus stolonifer-Tomato interaction / S. Bautista-Banos, M. G. Velaquez-Del Valle, A. N. Hernandez-Lauzardo, E. A. Barka // Plant-Microbe Interactions. 2008. P. 269–289.

Bautista-Banos S., Bosquez-Molina E., Barrera-Necha L. L. Rhizopus stolonifer (soft rot) // Postharvest decay. 2014. P. 1–44.

КОЛЛЕКЦИЯ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ КАК ОСНОВА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

**О. В. Турковская, С. Н. Голубев, Е. В. Дубровская,
А. Д. Бондаренкова, А. Ю. Муратова**

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов, turkovskaya_o@ibppm.ru

Взаимодействия, лежащие в основе формирования растительно-микробных симбиозов и ассоциаций, предполагают целый комплекс различных реакций, которые зависят как от характеристик партнеров, так и условий окружающей среды. По связям с растением микроорганизмы в корневой зоне условно можно разделить на симбиотические, ассоциативные и эндофитные. Их объединяют в группу так называемых PGPR (plant growth promoting rhizobacteria – стимулирующие рост растений ризобактерии). Фитостимулирующая активность этих бактерий обусловлена рядом свойств, таких как фиксация атмосферного азота, продукция фитогормонов, солиubilизация фосфатов, контроль патогенов и других.

В качестве научной базы для исследований подобных микроорганизмов функционирует Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (www.collection.ibppm.ru), основанная в 1981 г. и заявленная как специализированная научная коллекция, ориентированная на собрание и поддержание непатогенных бактерий, выделенных, в основном, из корней и корневой зоны растений. В настоящее время фонд коллекции включает более 600 штаммов бактерий и грибов, относящихся к 30 родам, и продолжает пополняться. Ядро коллекции составляют почвенные азотфиксирующие альфа-протеобактерии рода *Azospirillum*, являющиеся признанными во всем мире модельными объектами для изучения молекулярных механизмов растительно-микробных взаимодействий. Они относятся к ассоциативным бактериям, по определению не образующим морфологических структур у растений и представляют особый интерес, являясь основой так называемого феномена «ассоциативного симбиоза». На протяжении более 40 лет в ИБФРМ РАН ведутся исследования по выяснению молекулярных механизмов формирования этого симбиоза [Турковская, Голубев, 2020]. Особое место в исследованиях занимают структуры и молекулы азоспирилл, вовлеченные в его образование, такие как внеклеточные полисахаридсодержащие комплексы и лектины. При этом одним из ключевых приемов изучения являются разработанные иммунохимические методы, позволившие достаточно подробно описать организацию поверхности бактерий. Детально изучены геном ряда штаммов азоспирилл, процессы формирования биопленок, механизмы подвижности, реакции на стрессы и др. На данный момент в коллекции хранятся 196 штаммов азоспирилл различных видов, в том числе 21 типовых и 168 выделенных с корней дикорастущих и культурных растений в ходе экспедиций по Саратовской области. Это самое крупное собрание азоспирилл среди европейских коллекций. Следует отметить, что в нашей коллекции представлена большая часть типовых штаммов из 30 известных на данный момент видов рода *Azospirillum*.

Азоспириллы привлекают к себе повышенное внимание не только как общепринятые модельные объекты в исследованиях феномена растительно-микробной ассоциативности, но как биоудобрения в сельском и лесном хозяйстве, как биопрепараты экологической направленности – для очистки почвы от поллютантов. Наличие богатого коллекционного материала позволяет обнаруживать новые полезные свойства ризосферных бактерий, такие как «зеленый» синтез наночастиц металлов, продукция поли-β-гидроксibuтирата и левана, с использованием штаммов коллекции разрабатываются биосенсорные методы детекции различных соединений [Use of *Azospirillum baldaniorum* ... , 2023].

Изучение откликов бактерий на стрессовые воздействия особенно актуально при формировании растительно-микробной ассоциации в условиях техногенного загрязнения. Именно здесь открываются поистине безграничные возможности формируемых сообществ различных организмов

восстанавливать окружающую среду особенно в условиях мультзагрязнения и комбинированного стресса [Physiological-biochemical reactions ... , 2024]. При этом важнейшим аспектом являются обнаруженные процессы, связанные с разноплановым влиянием ризосферных микроорганизмов на поглощение металлов растениями из почвы и потому взаимоисключающие их применение для аграрных и экологических биотехнологий. Это требует более детального изучения особенностей применения биопрепаратов на основе стимулирующих рост растений бактерий [Влияние ионов ... , 2022; Олексенко, Крючкова, Ткаченко, 2022].

Особый интерес представляют штаммы PGPR, обладающие способностями разрушать поллютанты. Сопряженный метаболизм ПАУ обнаружен нами на примере *Ensifer meliloti* в ризосфере сорго и люцерны [Turkovskaya, Muratova, 2019], где показано участие в процессе деградации поллютанта ферментов как микро-, так и макропартнеров. Несмотря на то что взаимовлияние ассоциативного микроорганизма и растения очевидно, изучение ризосферных процессов выявляет все новые аспекты, которые позволяют приблизиться к разработке предсказуемых биотехнологий. Например, такие компоненты корневых экссудатов, как флавоноиды, в зависимости от их концентрации способны влиять на процесс деградации ПАУ в диапазоне от стимуляции до ингибирования [Влияние компонентов ... , 2022].

Еще более актуальными представляются исследования процессов, максимально приближенных к природным – это тройственные взаимодействия растений, грибов и бактерий, которые в настоящее время являются предметом повышенного внимания международного научного сообщества. Эти знания важны как для фундаментальной науки, так и для разработки новой стратегии фиторемедиации.

В связи с вышесказанным важно отметить, что коллекция не только обеспечивает сохранность изучаемых микроорганизмов, совершенствуя методы хранения и консервации штаммов, предоставление аутентичных культур пользователям, но и корректирует таксономическое положение штаммов на основании совокупности вновь получаемых гено- и фенотипических данных с использованием новейших методов и представляет собой богатейший материал для современных молекулярно-генетических и биоинформатических исследований.

Специализация коллекции в области ризосферных микроорганизмов позволила создать уникальное собрание штаммов и систематизированной научной информации, что является обоснованием ценности подобных биоресурсных хранилищ, делая их незаменимым источником поддержки как для научных исследований микробиомов, так и практической биотехнологии.

Литература

Влияние ионов меди на ассоциации бактерий рода *Azospirillum* с проростками пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / А. Ю. Муратова, Е. В. Любунь, С. Н. Голубев, О. В. Турковская // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. Т. 26, № 5. С. 477–485.

Влияние компонентов корневых экссудатов растений на деградацию фенантрена ризобактерией *Mycolicibacterium gilvum* / Л. В. Панченко, Д. А. Кузянов, Е. В. Плешакова [и др.] // Поволжский экологический журнал. 2022. № 2. С. 193–205.

Олексенко А. В., Крючкова Е. В., Ткаченко О. В. Влияние ризосферных бактерий *Ochrobactrum cytisi* IPA 7.2 на устойчивость растений горчицы белой к ионам меди, глифосату и глифосат-металлическим комплексам // Аграрный научный журнал. 2022. № 8. С. 20–24.

Турковская О. В., Голубев С. Н. Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: значение для исследования растительно-бактериальной ассоциативности // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. Т. 24 (3). С. 315–325.

Physiological-biochemical reactions of *Sorghum bicolor* to bacterization and impact of pollutants / O. V. Turkovskaya, A. D. Bondarenkova, S. N. Golubev [et al.] // Russian J. Plant Physiol. 2024. Vol. 71. Art. 32.

Turkovskaya O. V., Muratova A. Yu. Plant-bacterial degradation of polyaromatic hydrocarbons in the rhizosphere // Trends in Biotechnology. 2019. Vol. 37, N 9. P. 926–930.

Use of *Azospirillum baldaniorum* cells in quercetin detection / M. V. Kanevskiy, I. S. Kosheleva, V. O. Menukhov [et al.] // ADMET & DMPK. 2023. Vol. 11, N 2. P. 277–291.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РИЗОБАКТЕРИЙ В ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

О. А. Федорова, Ю. Н. Санеева, Н. В. Безлер

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара
им. А. Л. Мазлумова, Воронежская область, fed-olga78@mail.ru

Микробные препараты являются важнейшими средствами защиты растений от вредителей и болезней в органическом (биологическом, экологическом) земледелии. Главной особенностью этих средств защиты является их безопасность для человека, окружающей среды, домашних и диких животных, насекомых (опылителей, энтомофагов) и других представителей биоценоза [Кожемяков, 2005]. Биологическая защита растений от болезней и вредителей актуальна и в свекловодстве, где часто наблюдается эпифитотийное распространение листовых болезней, гнилей корнеплодов во время вегетации и хранения, в результате чего отмечается ежегодное снижение урожая до 16 % [Стогниенко, 2018]. Одними из перспективных микроорганизмов – продуцентов антибиотически активных веществ являются актиномицеты, которые благодаря способности вступать в ассоциации с растениями и способствовать их росту и развитию, относятся к группе PGPR (ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений). Отсутствие разработок по использованию актиномицетов в качестве продуцентов биопрепаратов в специфических условиях выращивания сахарной свеклы определяет актуальность изучения данной проблемы.

Исследования проводили в 2021–2023 гг. на опытном участке ВНИИСС в соответствии с методикой полевого опыта в 4-польном зернопаропропашном севообороте с чередованием культур: пар – озимая пшеница – сахарная свёкла – ячмень. Технология возделывания культуры – общепринятая для ЦЧР. Схема полевого опыта включала 3 варианта. В

качестве объекта исследования служили штаммы актиномицетов *Streptomyces sp.3*, *Streptomyces sp.9*, которые вносили на делянки под предпосевную культивацию в виде водной суспензии опрыскивателем (использовали водопроводную воду) с титром жизнеспособных клеток 10^5 КОЕ/мл. Контролем служила делянка, не обработанная бактериальной суспензией. Расход рабочей жидкости – 200 л/га. Для посева использовали семена сахарной свёклы диплоидного гибрида РМС 127.

Благодаря способности продуцировать широкий спектр антибиотически активных веществ актиномицеты, являясь компонентом микробного комплекса ризосферы, могут оказывать существенное влияние на возбудители болезней растений, осуществляя тем самым биозащитные функции. Использование метода выращивания растений сахарной свёклы в 0,7 % полумягком голодном агаре, инокулированного ризобактериями рода *Streptomyces*, позволило дать первичную оценку колонизирующей способности культур, а также показать перспективность их использования в посевах сахарной свёклы. Результаты лабораторного опыта показали, что отобранные культуры актиномицетов активно колонизировали корневую систему сахарной свёклы, тем самым создавая защитный «барьер» для проникновения фитопатогенных микроорганизмов.

Наиболее распространенным и вредоносным заболеванием сахарной свёклы является корнеед, поражающий молодые растения. Корнеед, черная ножка – заболевание корней и гипокотила проростков сахарной свёклы, проявляющееся в виде перетяжки на гипокотиле или корешке или сплошного почернения корешка проростка. Многолетние исследования ученых ВНИИСС им. А. Л. Мазлумова показали, что в патоккомплексе возбудителей корнееда доминируют грибы рода *Fusarium*, а именно *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium avenaceum*, а также представители бактериальной микрофлоры [Стогниенко, 2018].

Наблюдения за ростом и развитием сахарной свёклы показали, что распространение корнееда в вариантах опыта с стрептомицетами было ниже по сравнению с контролем. Так, степень распространения данного заболевания при внесении штамма *Streptomyces sp. 3* снижалась до 6,0 %, а при внесении *Streptomyces sp. 9* – до 11,2 % (в контроле – 13,8 %). Интродукция штамма *Streptomyces sp.3* оказалась более эффективной в сдерживании данного заболевания, что, по-видимому, связано с более активным продуцированием антибиотических соединений. Снижение заболеваемости растений сахарной свёклы свидетельствует о фитопротекторных способностях вносимых в агроценоз ризобактерий.

Определение супрессивности почвы под влиянием вносимых культур проводили по методу Тороповой Е. Н. в отношении одного из токсигенного микромицета *Fusarium oxysporum*, продуцирующего микотоксины, опасные для теплокровных животных [Пат. № 2568913].



Рис. Определение супрессивности почвы на опытном участке при внесении суспензии *Streptomyces sp.9*

Повышение защитных свойств почвы путем обогащения ризосферы микроорганизмами-анагонистами препятствует инфицированию растений, не допуская их массового заболевания. Почвы на контрольном участке относятся к больным, о чем свидетельствует показатель их супрессивности – 42,1 %. Внесение культуры *Streptomyces sp.3* лишь незначительно повышает уровень супрессивности до 45,9 %. Наибольшее влияние на повышение данного показателя почвы оказывает внесение культуры *Streptomyces sp.9*. При этом уровень супрессивности повышается до 75,7 %, почвы на опытном участке относятся к здоровым почвам.

Таким образом, благодаря действию ризобактерий на агроценоз сахарной свеклы создаются условия для элиминирования или стабилизации развития возбудителей почвенных болезней, что в дальнейшем может быть использовано при разработке систем защиты растений сахарной свеклы от основных возбудителей болезней. Представленные исследования являются начальным этапом в разработке способов и приемов биоконтроля болезней посевов сахарной свеклы с использованием ризобактерий.

Литература

Кожемяков А. П., Чеботарь В. К. Биопрепараты для земледелия // Биопрепараты в сельском хозяйстве. 2005. С. 18–54.

Стогниенко О. И. Патоконплексы микобиоты сахарной свёклы и методы снижения их вредоносности в ЦЧР России : автореф. дис. д-ра биол. наук : 06.01.07. М., 2018. 43 с.

Пат. № 2568913 Рос. Федерация, МПК G01N33/00. Способ определения супрессивности почвы : № 2014126924/15 : заявл. 01.07.2014 : опубл. 20.11.2015 / Е. Н. Торопова, А. А. Кириченко ; заявитель Новосиб. гос. аграр.ун-т. 5 с.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СОСУДИСТОМУ БАКТЕРИОЗУ (*XANTHOMONAS CAMPESTRIS* DOWS.) УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ КАПУСТЫ БЕЛОКОЧАННОЙ

С. Л. Фролова, Е. Г. Козарь, Л. Л. Бондарева

Федеральный научный центр овощеводства
Одинцово, svetlanaleonidovna95@gmail.com

В условиях современного рынка потребительский спрос постоянно растет и меняется. Это создает необходимость в наличии у селекционера генетически разнообразного и стабильного материала для создания гомозиготных линий. Решение этой проблемы возможно за счет применения биотехнологических методов в создании новых высокопродуктивных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений [Создание гибридов ... , 2017]. В современной селекции капустных культур приоритетным является создание гибридов F₁. На получение константных родительских линий при использовании традиционных методов селекции уходит от 6 до 12 лет, поэтому в настоящее время широко внедряются ДН-технологии, что позволяет ускорить селекционный процесс на целевой признак в 2–4 раза [Усовершенствование методов ... , 2019].

Самой распространенной и вредоносной болезнью капустных культур на территории Российской Федерации является сосудистый бактериоз – возбудитель *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Хсс), проникающий в растение через гидатоды, устьица или механические повреждения [Орынбаев, Джалило, Монахос, 2019; Vicente, Holub, 2013]. Наличие идентифицированных 11 рас Хсс и отсутствие доноров доминантных генов устойчивости ко всем расам осложняет селекционный процесс. Самыми распространенными в РФ и мире являются расы Хсс1 и Хсс4, но встречаются расы Хсс3 и Хсс6. Устойчивость растений капусты даже к одной расе Хсс определяется наличием нескольких генов, что осложняет создание линий с групповой устойчивостью к разным расам. Гаплоидные технологии, кроме ускорения селекционного процесса, расширяя спектр формообразовательного процесса, облегчают отбор полезных генов, способствуют обнаружению редких рецессивных аллелей генов устойчивости к болезням, т. е. помогают создать уникальные формы, в том числе и с групповой устойчивостью.

Получение ДН-растений на основе донорных растений разных морфотипов и устойчивости к сосудистому бактериозу проводили согласно разработанному протоколу на базе лаборатории репродуктивной биотехнологии сельскохозяйственных растений (ФГБНУ ФНЦО) с последующей адаптацией растений-регенерантов *in vivo* в контролируемых условиях [Технология получения ... , 2016]. Оценку на устойчивость к четырем расам Хсс проводили на базе лаборатории молекулярно-иммунологических

исследований ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства» (ФГБНУ ФНЦО) путем искусственного заражения отделенных листьев растений-регенерантов на стадии штеклингов по модифицированной методике, позволяющей проводить индивидуальную оценку реакции ДН-растений к нескольким расам патогенна, сохранить их для дальнейших исследований и получения семенного потомства. Для заражения использовали инокулюм двухсуточных бактериальных культур возбудителей (10^6 кл./мл, среда LB), контроль – стерильная вода. Учет проводили в динамике по пяти-бальной шкале в течение 20 сут.

Анализ всей совокупности полученного потомства ДН-растений от восьми доноров выявил, что большая часть исследованных генотипов проявили восприимчивость ко всем расам Хсс, тогда как относительную устойчивость проявило 3–23 % от общего числа ДН-растений в зависимости от расы (рис., А). При этом доля генотипов, проявляющих устойчивость к одной или нескольким расам зависит от устойчивости исходного донорного растения. То есть в результате расщепления и рекомбинации генов в потомстве даже восприимчивого донорного растения появляются удвоенные гаплоиды с относительной устойчивостью к отдельным расам Хсс. Наибольший процент устойчивых ДН-растений, соответственно, отмечен в потомствах донорных растений № 1 и № 4 из относительно устойчивой группы. Важно отметить, что все проанализированные ДН-растения потомства донора № 1 не поразились расой Хсс4 (рис., Б).

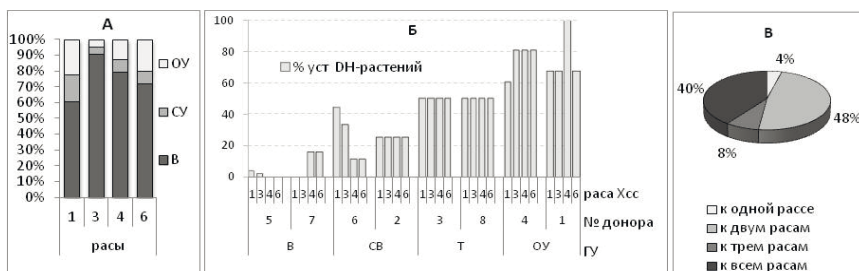


Рис. Соотношение генотипов с разной степенью устойчивости к отдельным расам Хсс (А); процент устойчивых ДН-растений к расам Хсс в потомстве донорных растений из разных групп устойчивости (Б); распределение на группы в зависимости от сочетания устойчивости к разным расам Хсс (В). Обозначения: ОУ – относительно устойчивы; СУ – среднеустойчивы; В – восприимчивы; УСТ – устойчивые; ГУ – группы устойчивости

В группе выделенных относительно устойчивых генотипов наибольший удельный вес составили ДН-растения, проявившие устойчивость к двум и четырем анализируемым расам – 48 и 40 % соответственно (рис., В). Среди них наибольший интерес для дальнейшей селекции на групповую устойчивость ко всем расам Хсс представляют три ДН-растения из потомства исходного генотипа № 4 и единичные ДН-растения из потомств от донорных генотипов № 1 и № 2.

Таким образом, показана информативность использования методики заражения отделенных листьев для изучения устойчивости ДН- растений к возбудителям Хсс. В результате уже на ранней стадии развития среди полученных удвоенных гаплоидов нам удалось выделить уникальные генотипы с групповой устойчивостью к разным расам Хсс, которые будут включены в селекционный процесс по созданию гомозиготных линий капусты белокочанной с высокой устойчивостью к сосудистому бактериозу.

Литература

Орынбаев А. Т., Джалило Ф. С., Монахос Г. Ф. Методы оценки и характер наследования стеблевой устойчивости к сосудистому бактериозу у белокочанной капусты // Известия ТСХА. 2019. № 1. С. 45–55.

Создание гибридов капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba* DC) нового поколения с использованием линий удвоенных гаплоидов / В. Ф. Пивоваров, Л. Л. Бондарева, Н. А. Шмыкова [и др.] // Сельскохозяйственная биология. 2017. № 52 (1). С. 143–151.

Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор семейства Капустные / Е. А. Домблдес, Н. А. Шмыкова, Д. В. Шумилина [и др.]. М.: ФНЦ овощеводства, 2016. 40 с.

Усовершенствование методов создания гибридов капусты белокочанной / А. И. Минейкина, Л. Л. Бондарева, Д. В. Шумилина [и др.] // Овощи России. 2019. № 4. С. 3–7.

Vicente J. G., Holub E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops // *Molecular plant pathology*. 2013. Vol. 14, N 1. P. 2–18.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУСПЕНЗИЙ *CHLORELLA VULGARIS* D1 И D2 НА ПРОРАСТАНИЕ И ЭНЕРГИЮ ВСХОЖЕСТИ КРЕСС-САЛАТА, ОГУРЦА, РЕДИСА И ТОМАТА

А. А. Худокормов, Е. А. Шевченко, А. А. Самков, Н. Н. Волченко,
Е. В. Моисеева, М. Н. Круглова

Кубанский государственный университет
Краснодар, sashokas@yandex.ru

Биологические удобрения (биоудобрения) с использованием микроорганизмов получили широкое распространение, как в сельскохозяйственном производстве, так и в частном использовании. Например, активно применяются различные штаммы вида *Chlorella vulgaris*. Суспензия микроводорослей способна выделять ряд физиологически активных веществ, поэтому эффективно влияет на рост и развитие высших растений. Действенность биостимуляторов для стимулирования роста растений часто объясняется их способностью прямо или косвенно обеспечивать растения минеральными питательными веществами (в основном N, но также P, S и другими макро- и микроэлементами) [Максаева, Ермакова, Кудрявцева, 2021]. Внесение суспензии происходит на различных стадиях выращивания культур растений: при обработке почвы, при проращивании семян, а также посредством опрыскивания проростков. Исходя из этого,

микроводоросль может использоваться как полноценное удобрение, удовлетворяющие потребности растений на разных этапах роста. Кроме того, они способны выделять значительные количества растительных гормонов, полиаминов, бетаинов, ауксинов, цитокининов, гиббереллинов и брассиностероидов [Волшенкова, Фролов, 2020]. После отмирания одноклеточная водоросль разлагается естественным образом, а в почву попадают органические вещества, макро- и микроэлементы, что способствует легкой минерализации. В почве *Chlorella vulgaris* благоприятно воздействует на развитие здоровой микробиологической активности и поддержания биологических процессов [Гундарева, Галахова, 2018]. Объектами исследования являлись культуры водорослей *Chlorella vulgaris* D1 и D2 из коллекции кафедры генетики, микробиологии и биохимии, а также семена высших культурных растений: кресс-салат (*Lepidium sativum* L.), огурец (*Cucumis sativus* L.), томат (*Lycopersicon lycopersicum* L.), редис (*Raphanus sativus* L.). Для изучения влияния суспензий зеленых водорослей проводилась оценка всхожести и энергии прорастания семян. Для этого 100 шт. семян каждого растения замачивали в 3 параллелях опытов: 1) контроль (вода); 2) суспензия с *Chlorella vulgaris* D1; 3) суспензия с *Chlorella vulgaris* D2. Сроки энергии прорастания и всхожести для кресс-салата 3 и 5 сут., огурца – 3 и 7 сут., для редиса – 3 и 6 сут., для томата – 5 и 10 сут. соответственно [ГОСТ 12038-84]. На первом этапе оценивали влияние исследуемых культур микроводорослей на всхожесть семян (рис. 1).

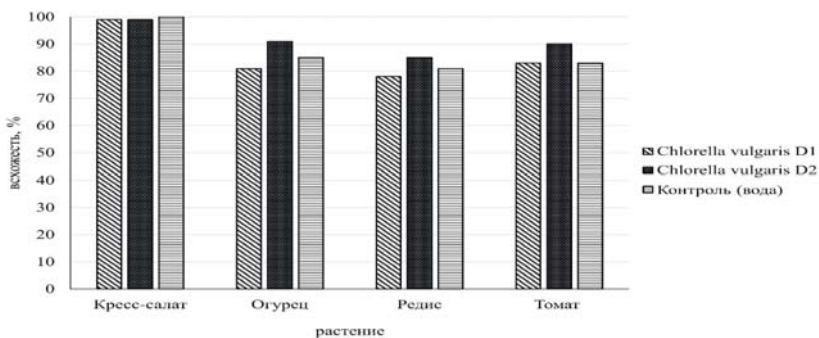


Рис. 1. Влияние культур микроводорослей *Chlorella vulgaris* D1 и D2 на всхожесть семян

Кресс-салат показал практически максимальные значения (99–100 %) по всхожести вне зависимости от вариантов эксперимента. Внесение суспензии *Chlorella vulgaris* D1 не оказывало достоверного влияния на всхожесть семян всех исследуемых растений, в то время как суспензия *Chlorella vulgaris* D2 достоверно влияла на всхожесть семян огурца и томата увеличивая их по отношению к контролю на 7 %.

Оценка влияния исследуемых культур микроводорослей на энергию прорастания семян представлена на рис. 2.

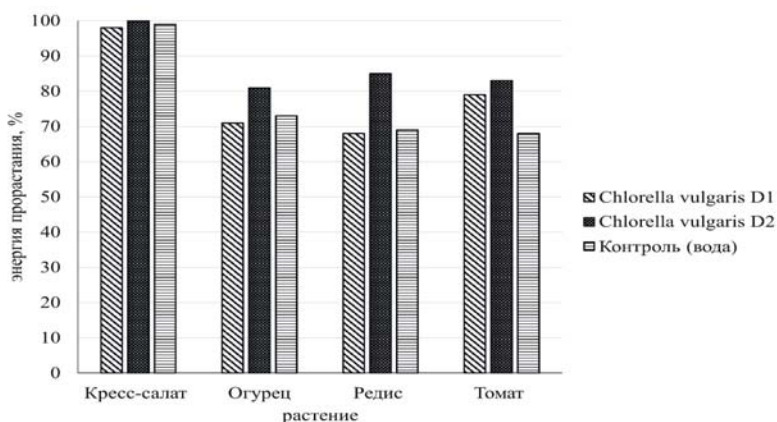


Рис. 2. Влияние культур микроводорослей *Chlorella vulgaris* D1 и D2 на энергию прорастания семян

Кресс-салат показал максимальные значения энергии прорастания (98–100 %) вне зависимости от вариантов эксперимента. При использовании суспензии *Chlorella vulgaris* D1 энергия прорастания достоверно не отличалась от контроля для всех исследуемых растений, за исключением томата, где она была на 11 % выше, чем в контроле. Внесение суспензии *Chlorella vulgaris* D2 вызывало увеличение энергии прорастания у огурца на 8 %, у редиса на 16 %, у томата на 15 %. Таким образом прослеживается штаммоспецифичная ростостимулирующая активность микроводорослей по отношению к исследуемым растениям, что делает возможным использование суспензии *Chlorella vulgaris* D2 для увеличения всхожести и энергии прорастания огурца, редиса и томата.

Литература

- Волшенкова Е. С., Фролов Д. И. Влияние удобрения с применением микроводоросли хлореллы на урожайность томатов // Цифровизация агропромышленного комплекса : сб. науч. ст. II Междунар. науч.-практ. конф. В 2 т. Тамбов, 21–23 окт. 2020 г. Т. 1. 2020. С. 293–296.
- ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести : введен в действие Постановлением Госкомитета СССР по стандартам от 19 дек. 1984 г. № 4710М., 1986. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200023365> (дата обращения: 15.12.2022)
- Гундарева Ю. А., Галахова Е. Н. Суспензия *Chlorella vulgaris* – природный стимулятор развития растений // Актуальные направления научных исследований: перспективы развития : сб. материалов V Междунар. конф. 2018. С. 11–13.
- Максаева А. О., Ермакова Л. С., Кудрявцева Ю. С. Положительные аспекты применения *Chlorella vulgaris* в качестве биоудобрения // Энигма. 2021. № 31. С. 118–120.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ

М. В. Худяева¹, В. К. Чеботарь¹, М. Е. Баганова¹, О. В. Келейникова¹,
А. В. Ерофеева¹, О. С. Юзихин¹, Е. П. Чижевская¹, Р. Д. Костицын²,
О. В. Хонина², Н. Г. Лапенко², И. А. Тихонович^{1,3}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, khudyayeva@list.ru

²Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр
Михайловск lapenko31@yandex.ru

³Санкт-Петербургский государственный университет
Санкт-Петербург i.tikhonovich@spbu.ru

В последнее время стресс от засухи считается важнейшей проблемой, которая негативно влияет на рост, развитие растений и, что более важно, на урожайность [Drought coping ..., 2017]. В будущем удовлетворение потребностей перенаселенного мира в продовольствии станет наиболее острой проблемой из-за резкой потери пахотных земель в результате засухи [Arabidopsis EDT1/HDG11 ..., 2016]. На сегодняшний день в сельском хозяйстве применяются различные методы защиты растений от абиотических и биотических факторов окружающей среды [Biotechnological Potential ... , 2023]. Использование биологических средств защиты растений на основе микроорганизмов, стало актуальным в растениеводстве за последнее десятилетие [Endophytic microbes ... , 2020]. Согласно последним исследованиям, микробиом может влиять на скорость роста растения-хозяина и повышает его устойчивость к болезнетворным организмам. Показано, что в неблагоприятных условиях может формироваться «стрессовый микробиом», обеспечивающий устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам [Plant-microbiome interactions ... , 2020].

Целью наших исследований являлось изучение микробиомов засухоустойчивых растений, с целью создания микробиологических препаратов, содержащих полезные виды эндофитных и эпифитных бактерий, увеличивающих урожайность растений и их устойчивость к стрессам. При изучении эндофитного микробиома растений произрастающих в экстремально засушливых и засоленных регионах Ставропольского края России, была собрана коллекция засухоустойчивых и восстанавливающихся после высыхания растений мари белой (*Chenopodium album* L.), житняка пустынного (*Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schut.) и верблюжьей колючки обыкновенной (*Alhagi pseudalhagi*). Для поиска функционально ценных для растений микроорганизмов были выделены эндофитные бактерии. По разработанной методике выделения эндофитных бактерий из стеблей, листьев и корней этих растений было выделено 69 изолятов эндофитных бактерий: из мари белой – 45 штаммов, житняка пустынного – 18 штаммов и верблюжьей колючки обыкновенной – 6 штаммов (табл.). Идентификация выделенных изолятов показала, что 59 штаммов относятся к роду *Bacillus*.

Ферментативные свойства эндофитных бактерий

Штамм	Ферментативные свойства					
	Азотфиксирующая активность	Фосфатмобилизирующая активность	Амилолитическая активность	Протеолитическая активность	Целлюлозолитическая активность	Липолитическая активность
Can06L	-	-	+	+	+	-
Can09L	-	-	+	+	+	-
Can10L	-	+	+	+	+	+
Can19L	-	+	+	+	+	-
Can06R	+	+	-	-	-	+
Can03S	-	-	+	+	+	+
Adn01R	-	-	+	+	+	+
Adn03R	-	+	-	+	+	+

Исследование влияние эндофитов на развитие фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* штамм 60519 и *Rhizoctonia solani* штамм 1.2 показало антифунгальную активность у 22 штаммов (коэффициент ингибирования более 50 %), а 9 штаммов проявили бактерицидную активность против фитопатогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum* штамм 5128, *Clavibacter michiganensis* штамм 5351, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* штамм 23, *Pseudomonas* sp. штамм 8949 (зона ингибирования от 15 до 17 см).

Показано, что 24 штамма были способны к росту при +50 °С, а 9 штаммов к росту при +55 °С. Способность к росту при добавлении в среду 5 % NaCl обнаружена у 54 штаммов, а при добавлении 10 % NaCl только у 10 штаммов. Ряд штаммов эндофитных бактерий были способны продуцировать значительное количество индолил-3-уксусной кислоты (ИУК).

Таким образом, выделенные эндофитные бактерии засухоустойчивых растений можно рассматривать как перспективных кандидатов для создания микробиологических препаратов для борьбы с биотическими и абиотическими стрессовыми факторами окружающей среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-66-10013

Литература

- Arabidopsis EDT1/HDG11 improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field / L. H. Yu, S. J. Wu, Y. S. Peng [et al.] // Plant Biotechnology Journal. 2016. Vol. 14. P. 72–84.
- Biotechnological Potential of Galophytes and Their Microbiomes for Agriculture in Russia and Kazakhstan / V. K. Chebotar, E. P. Chizhevskaya, O. V. Khonina [et al.] // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. Vol. 70, N. 183.
- Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop / A. Ullah, H. Sun, X. Yang, X. Zhang // Plant Biotechnology Journal. 2017. Vol. 15. P. 271–284.
- Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability / K. L. Rana, D. Kour, T. Kaur [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. 2020. Vol. 113. P. 1075–1107.
- Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health / P. Trivedi, J. E. Leach, S. G. Tringe [et al.] // Nature Reviews Microbiology. 2020. Vol. 18. P. 607–621.

ДИНАМИКА ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ РАЗВИТИИ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

**В. Е. Цыганов, А. Б. Китаева, П. Г. Кусакин, А. П. Горшков,
Е. А. Киричек, А. В. Цыганова**

Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии, Санкт-Петербург, vetsyganov@arriam.ru

Динамика тубулинового цитоскелета играет ключевую роль в дифференцировке клеток при развитии симбиотических клубеньков. Первые изменения в организации микротрубочек наблюдаются на самых ранних стадиях развития клубеньков – в клетках корневых волосков, которые подвергаются действию Nod-факторов [Tsyganov, Kitaeva, Demchenko, 2019]. Инициация роста инфекционной нити сопровождается перестройкой элементов тубулинового цитоскелета и движением ядра в клетке корневого волоска. Так, было показано, что микротрубочки формируют плотную сеть, окружающую растущую инфекционную нить и связывающую кончик инфекционной нити с ядром, при этом продольные микротрубочки располагались параллельно инфекционной нити. В наружной коре корня формирование преинфекционных нитей сопровождается полным исчезновением кортикальных микротрубочек, а эндоплазматические микротрубочки, ориентированные параллельно друг другу в центральном цитоплазматическом мостике, соединяют противоположные стороны клетки. В клетках внутренней коры корня кортикальные микротрубочки изменяют свою ориентацию от регулярного паттерна, когда они расположены параллельно друг другу до нерегулярного. Эндоплазматические микротрубочки при этом соединяют ядро с периферией клетки.

Проведенный нами сравнительный анализ организации тубулинового цитоскелета у шести видов бобовых растений, формирующих недетерминированные клубеньки (с продолжительной активностью меристемы) [Comparative analysis ... , 2016; General patterns ... , 2021; *Glycyrrhiza uralensis* ... , 2021] и четырех видов с детерминированными клубеньками (с ограниченной активностью меристемы) [Tubulin cytoskeleton ... , 2022] позволил выявить как общие, так и видоспецифические паттерны микротрубочек.

В клетках меристемы в клубеньках всех анализируемых видов кортикальные микротрубочки формировали неупорядоченный паттерн (они располагались под разными углами), а эндоплазматические микротрубочки связывали ядро с периферией клетки. В молодых инфицированных клетках в клубеньках всех изученных видов эндоплазматические микротрубочки были ассоциированы с инфекционными нитями и инфекционными каплями, определяя направление их роста. В азотфиксирующих клетках эндоплазматические микротрубочки формировали сеть среди симбиосом. При этом для разных видов бобовых растений, формирующих

недетерминированные клубеньки, были характерны нерегулярный, регулярный или промежуточный паттерны их организации, в то время как в детерминированных клубеньках был выявлен только нерегулярный паттерн. Вероятно, выявленные различия связаны с ярко выраженными различиями в морфологии бактериоидов, наблюдаемые между различными видами Бобовых с недетерминированными клубеньками.

В неинфицированных клетках кортикальные микротрубочки формировали нерегулярный паттерн в клубеньках *Glycine max* и *G. soja*, в то время как для остальных видов был характерен регулярный паттерн (микротрубочки были ориентированы поперечно продольной оси клетки). В недетерминированных клубеньках в инфицированных клетках кортикальные микротрубочки формировали неупорядоченный паттерн, а в зрелых клетках детерминированных – упорядоченный. Выявленные различия в организации кортикальных микротрубочек в различных типах клубеньков указывают на возможный переход в ходе эволюции инфицированных клеток от анизотропного роста в детерминированных клубеньках к изотропному росту в недетерминированных клубеньках. Можно предположить, что этот переход обеспечил некоторое эволюционное преимущество видам Бобовых с недетерминированными клубеньками, например, позволяя им более эффективно размещать симбиосомы в инфицированных клетках.

Таблица 1

Сравнительный анализ микротрубочек в детерминированных клубеньках *Glycine max*, *Glycine soja*, *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus* и недетерминированных клубеньках *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*, *Galega orientalis*, *Cicer arietinum*, *Vicia sativa*, *Glycyrrhiza uralensis*

Тип клеток	Тип микротрубочек	<i>Pisum sativum</i>	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Galega orientalis</i>	<i>Vicia sativa</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Glycine soja</i>	
Меристематические	корт.	Нерегулярный										
	эндо.	Митотические веретена делений, препрофазные пояски, перинуклеарные										
Молодые инфицированные	корт.	Нерегулярный										
	эндо.	Сеть вокруг инфекционных нитей и капель										
Азотфиксирующие	корт.	Нерегулярный*							Регулярный			
	эндо.	Сеть среди симбиосом										
		Нерегулярный	Регулярный	Регулярный	Промежуточный	Нерегулярный	Нерегулярный	Нерегулярный				
Неинфицированные	корт.	Регулярный									Нерегулярный	
	эндо.	Не выявлен										

*Жирным шрифтом выделены различия между паттернами микротрубочек в детерминированных и недетерминированных клубеньках. Корт. – кортикальные микротрубочки, эндо – эндоплазматические.

Исследования были поддержаны грантом РФФ № 24-16-00156.

Литература

Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum*: bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements / A. B. Kitaeva, K. N. Demchenko, I. A. Tikhonovich [et al.] // New Phytologist. 2016. Vol. 210, N. 1. P. 168–183.

General patterns and species-specific differences in the organization of the tubulin cytoskeleton in indeterminate nodules of three legumes / A. B. Kitaeva, A. P. Gorshkov, E. A. Kirichek [et al.] // Cells. 2021. Vol. 10. Art. 1012.

Glycyrrhiza uralensis nodules: histological and ultrastructural organization and tubulin cytoskeleton dynamics / A. V. Tsyganova, A. B. Kitaeva, A. P. Gorshkov [et al.] // Agronomy. 2021. Vol. 11, N 12. Art. 2508.

Tsyganov V. E., Kitaeva A. B., Demchenko K. N. Comparative analysis of tubulin cytoskeleton rearrangements in nodules of *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* // The Model Legume *Medicago truncatula*. 2019. P. 547–553.

Tubulin cytoskeleton organization in cells of determinate nodules / A. B. Kitaeva, A. P. Gorshkov, P. G. Kusakin [et al.] // Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 13. Art. 823183.

СИМБИОТИЧЕСКИЙ ИНТЕРФЕЙС АПОПЛАСТА В КЛУБЕНЬКАХ БОБОВЫХ

А. В. Цыганова¹, Е. В. Селиверстова^{1,2}, В. Е. Цыганов¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, avtsyganova@arriam.ru, vetsyganov@arriam.ru

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, elena306@yandex.ru

В ходе развития бобово-ризобияльного симбиоза процесс интернализации ризобий зависит от модификации растительно-микробных поверхностей (симбиотического интерфейса) и в первую очередь от изменения состава и соотношения его компонентов в клеточных стенках как растительных клеток, так и инфекционных нитей. Различные компоненты симбиотического интерфейса играют важную роль в обеспечении позиционной информации во время ризобияльной инфекции и развития клубеньков. Дифференцировка инфицированных клеток и последовательные изменения их морфологии соответствуют последовательным изменениям молекулярного состава апопласта и поверхностных мембранных структур (плазмалеммы и симбиосомной мембраны). Проведенные исследования симбиотического интерфейса позволили выявить его общие и видоспецифичные признаки у растений, формирующих разные типы клубеньков (табл.) [Comparative analysis ... , 2019; Analysis of *Glycine max* ... , 2023; Tsyganova, Seliverstova, Tsyganov, 2023].

Таблица

Видоспецифические особенности симбиотического интерфейса
в клубеньках Бобовых

Вид	Клеточная стенка				Стенка инфекци- онной нити
	Меристемати- ческая клетка	Колонизиро- ванная клетка	Инфициро- ванная клетка	Неинфициро- ванная клетка	
<i>Pisum sativum</i>	остов РГ-I	Ca ²⁺ - связанный ГГ	*	*	галактан РГ-I
<i>Medicago truncatula</i>	галактан РГ-I	КГ	*	КГ Ca ²⁺ - связанный ГГ	Ca ²⁺ - связанный ГГ
<i>Galega orientalis</i>	галактан РГ-I	КГ	КГ	НМ ГГ остов РГ-I	галактан РГ-I
<i>Vavilovia formosa</i>	КГ, НМ ГГ	КГ, НМ ГГ	КГ, НМ ГГ	КГ	галактан РГ-I
<i>Vicia villosa</i>	*	НМ ГГ	галактан РГ-I	*	НМ ГГ
<i>Glycine max</i>	—	—	НМ ГГ, Ca ²⁺ - связанный ГГ	галактан РГ-I	КГ

Приведены только основные компоненты по данным флуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии. * – в состав клеточных стенок входят общие для всех изученных видов и типов клеток: высокометилэтерифицированный гомогалактуронан и рамногалактуронан I (остов и арабиановая боковая цепь). ГГ – гомогалактуронан, НМ ГГ – низкометилэтерифицированный гомогалактуронан, РГ-I – рамногалактуронан I, галактан – линейная (1→4)-α-L-галактановая боковая цепь, КГ — ксилоглюкан. Прочерк указывает на отсутствие данного типа клеток в детерминированных клубеньках *G. max*.

Для всех изученных видов Бобовых было характерно наличие высокометилэтерифицированного гомогалактуронана и рамногалактуронана I (его полисахаридного остова и арабиановой боковой цепи) во всех клеточных стенках и стенках инфекционных нитей, что соответствует изодиаметрически растущим клеткам. К наиболее ярким видовым особенностям симбиотического интерфейса в клубеньках недетерминированного типа можно отнести наличие линейной галактановой боковой цепи рамногалактуронана I в стенках инфекционных нитей у *Pisum sativum*, *Galega orientalis* и *Vavilovia formosa*, в отличие от клубеньков *Medicago truncatula* и *Vicia villosa*, относящихся к той же кладе с отсутствием инвертированных повторов (IRLC). Также к видоспецифическим особенностям можно отнести отсутствие фукозилированного ксилоглюкана в клеточных стенках в клубеньках *P. sativum*, его наличие в клеточных стенках колонизированных и неинфицированных клеток в клубеньках *M. truncatula*, в клеточных стенках всех типов клеток в клубеньках *V. formosa*. Наблюдаются вариации локализации и гомогалактуронана, особенно низкометилированного — он присутствует в стенках инфекционных нитей в клубеньках *V. villosa*, в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *G. orientalis* и в клеточных стенках всех типов клеток *V. formosa* (за исключением неинфицированных клеток). Ca²⁺-связанный гомогалактуро-

нан был характерен для клеточных стенок колонизированных клеток *P. sativum*, неинфицированных клеток *M. truncatula*, а также стенок инфекционных нитей *M. truncatula*. Неразветвленная основа рамногалактуронана I преимущественно выявлялась в меристематических клетках в клубеньках *P. sativum* и в клеточных стенках неинфицированных клеток в клубеньках *G. orientalis*. Состав и соотношение компонентов апопласта в клубеньках недетерминированного типа, ведущих свое происхождение от клеток перидермы и внутреннего слоя коры корня, отличается от таковых в клубеньках детерминированного типа, происходящих от клеток внешнего слоя клеток коры корня. К ярким видовым особенностям симбиотического интерфейса детерминированных клубеньков (на примере *Glycine max*) можно отнести присутствие галактановой боковой цепи рамногалактуронана I в клеточных стенках неинфицированных клеток и преимущественное накопление фукозилированного ксилоглюкана в стенках инфекционных нитей.

Таким образом, были выявлены различия в составе симбиотического интерфейса апопласта между клубеньками недетерминированного и детерминированного типов, что может отражать кардинальные различия в морфологии и физиологии населяющих их бактериоидов. В недетерминированных клубеньках бактериоиды претерпевают необратимую дифференцировку, тогда как в детерминированных способны к размножению. Выявленные видоспецифические различия в компонентах симбиотического интерфейса апопласта в недетерминированных клубеньках, принадлежащих к одной и той же кладе IRLC, также могут быть связаны с существенными различиями в морфологии бактериоидов. Ранее нами были выявлены различия в организации тубулинового цитоскелета в клубеньках различных видов Бобовых, формирующих как недетерминированные, так и детерминированные клубеньки. Наблюдаемые различия в составе симбиотического интерфейса апопласта еще раз указывают на необходимость и значимость изучения каждого отдельного вида Бобовых.

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-16-00090.

Литература

Analysis of *Glycine max* and *Galega orientalis* nodules revealed specific features of symbiotic interface organization in determinate and indeterminate nodules / A. V. Tsyganova, E. V. Seliverstova, A. P. Gorshkov, V. E. Tsyganov // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. Vol. 70. Art. 192.

Comparative analysis of remodelling of the plant–microbe interface in *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* symbiotic nodules / A. V. Tsyganova, E. V. Seliverstova, N. J. Brewin, V. E. Tsyganov // Protoplasma. 2019. Vol. 256, N 4. P. 983–996.

Tsyganova A. V., Seliverstova E. V., Tsyganov V. E. Comparison of the formation of plant–microbial interface in *Pisum sativum* L. and *Medicago truncatula* Gaertn. nitrogen-fixing nodules // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. Art. 13850.

МИКРОБИОМЫ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

**В. К. Чеботарь¹, М. В. Худяева¹, В. Н. Пищик¹, Е. П. Чижевская¹,
М. Е. Баганова¹, О. В. Келейникова¹, И. А. Фесенко², А. С. Мамаева²,
И. А. Тихонович^{1,3}**

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, vladchebotar@arriam.ru

²Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, fesigor@gmail.com

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
i.tikhonovich@spbu.ru

Загрязнение окружающей среды является общемировой проблемой, приводящей к многочисленным проблемам, включая глобальное потепление. В связи с этим нормальная температура поверхности Земли повышается в течение последних нескольких десятилетий [Phytoremediation of heavy] ... , 2015. Изменение климата прямо пропорционально стрессу от засухи. В последнее время стресс от засухи считается важнейшей проблемой, которая негативно влияет на рост, развитие растений и, что более важно, на урожайность. В будущем удовлетворение потребностей перенаселенного мира в продовольствии станет наиболее острой проблемой из-за резкой потери пахотных земель в результате засухи [Arabidopsis EDT1/HDG11 ... , 2016]. Согласно проанализированным исследованиям, опубликованным с 1980 по 2015 г., сообщалось, что из-за стресса от засухи во всем мире было зафиксировано снижение урожайности пшеницы на 21 % и кукурузы на 40 % [Daryanto, Wang, Jacinthe, 2016]. Чтобы обеспечить продовольствием постоянно растущее население, необходимо улучшить производство сельскохозяйственных культур в условиях засухи. Существует огромная потребность в разумных и благоприятных для окружающей среды стратегиях ведения сельского хозяйства в неблагоприятных условиях, т. е. при биотических и абиотических стрессах. Средства защиты растений от стресса, которые уменьшают засуху, переувлажнение, засоление, тяжелые металлы и патогенность будут приобретать все большее значение в будущем в связи со сценарием глобального изменения климата. В этом отношении использование полезных микроорганизмов могло бы стать средством защиты растений от стресса и привести к многообещающим решениям для устойчивого и благоприятного для окружающей среды сельского хозяйства. Во всем мире существует огромный растущий рынок микробиологических препаратов для улучшения роста растений и повышения урожайности в условиях биотических и абиотических стрессов с ежегодным темпом роста примерно на 10 % [Per-

spectives and ... , 2017]. Ассоциация растения с эндофитными бактериями оказывает благотворное влияние на рост растений, а также на устойчивость к абиотическим стрессам, т. е. стрессу от засухи. Эндофитные бактерии выделяют различные вещества, включая регуляторы роста растений, в очень низкой концентрации, вызывая физиологические, биохимические и молекулярные изменения, связанные с устойчивостью растений к засухе, которые улучшают способность соответствующего растения к засухоустойчивости [Natural rice ... , 2014]. Принимая во внимание эти аспекты, регуляторы роста растений, такие как ауксины, абсцизовая кислота и этилен, продуцируемые эндофитными бактериями могут оказывать очень большое влияние на устойчивость растений к засухе.

Целью наших исследований являлось изучение микробиомов и протеомов засухоустойчивых и восстанавливающихся после высыхания растений, выделение эндофитных и эпифитных микроорганизмов, изучение их полезных для сельскохозяйственных культур свойств с целью создания уникальных микробиологических препаратов, содержащие как полезные виды эндофитных и эпифитных бактерий, так и важные для регуляторных функций растений белки, увеличивающие урожайность растений и их устойчивость к стрессам.

Основным подходом для сбора образцов засухоустойчивых и восстанавливающихся после высыхания растений был поиск мест, где все изучаемые растения находятся в одном месте, произрастая на одной почве. Это дает возможность сравнения микробиомов растений и почв, а также определения, какое влияние на формирование эпифитного и эндофитного микробиома оказывает растение-хозяин и почва, на которой эти растения растут. В результате проведенной экспедиции в наиболее засушливые районы Ставропольского края-Нефтекумский, Левокумский, собраны образцы засухоустойчивых и восстанавливающихся после высыхания растений: мари белой (*Chenopodium album* L.), верблюжьей колочки обыкновенной (*Alhagi pseudalhagi* (Bieb.) Fisch.) и житняка пустынного (*Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schult.).

Для выделения эпифитных бактерий из исследуемых образцов засухоустойчивых растений был разработан общий протокол. Суть метода заключалась в получении смывов из растительного материала и приготовлении серийных разведений, из которых делались высевы на питательные среды. Для выделения эндофитных бактерий для каждого растения, был разработан отдельный протокол стерилизации и выделения эндофитных бактерий, отдельно из стеблей и из корней растений. Для оценки физиолого-биохимических свойств использовали следующие показатели: ферментативную активность (фосфатмобилизирующая, амилазная, липазная, протеазная, целлюлазная, азотфиксирующая), оптимальные показатели температуры роста и pH, способность продуцировать ауксины и растворять малодоступные для растений формы фосфора.

Из выделенных 69 штаммов эндофитных бактерий четыре штамма обладали азотфиксирующей активностью, семь штаммов фосфатмобилизирующей активностью, семнадцать штаммов амилолитической активностью, девятнадцать штаммов протеазной активностью, двадцать три штамма целлюлазной активностью и четыре штамма липазной активностью. Двадцать четыре штамма были способны к росту при 45 °С, а 5 штаммов росли и при 50 °С. Однако при 55 °С рост уже не наблюдался. Из филлосферы и стеблей аридных растений верблюжьей колючки (*Alhagi pseudalhagi* (Bieb.) Fisch.), житняка пустынного (*Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schult.) и мари белой (*Chenopodium album* L.) выделено 289 изолятов эпифитных бактерий, которые протестированы на способность продуцировать индолы, наличие или отсутствие фосфатмобилизирующей, амилазной, липазной, протеазной, целлюлазной, азотфиксирующей активности, способности продуцировать аммиак. Отобраны наиболее активные штаммы. Из проанализированных 60 штаммов ростстимулирующей активностью обладали восемь штаммов. При +50 °С был зафиксирован рост двух штаммов из верблюжьей колючки. На среде с 15 % NaCl был способен расти только один штамм. В Ведомственную коллекцию полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения депонировано 5 штаммов эндофитных и 3 штамма эпифитных бактерий.

Выявлен ряд протеомных изменений у растений яровой пшеницы и рапса в ответ на осмотический стресс. Показано, что меняется содержание белков, связанных с фотосинтезом, экспрессией генов, фолдингом белков, антиоксидантным ответом и т. д. Отдельный интерес представляют цистеин-богатые пептиды семейства nsLTP, которые меняются в ответ на засуху у растений рапса и яровой пшеницы и могут регулировать как стрессовые реакции, так и взаимодействие растения с микробиотой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-66-10013.

Литература

- Arabidopsis EDT1/HDG11 improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field / L. H. Yu, S. J. Wu, Y. S. Peng [et al.] // Plant biotechnology journal. 2016. Vol. 14. P. 72–84.
- Daryanto S., Wang L., Jacinthe P-A. Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production // PLOS ONE. 2016. Vol. 11, N 5. Art. e0156362.
- Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections / C. Spence, E. Alff, C. Johnson [et al.] // BMC Plant Biology. 2014. Vol. 14. Art. 130.
- Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement / S. Timmusk, L. Behers, J. Muthoni [et al.] // Frontiers in Plant Science. 2017. Vol. 8. Art. 49.
- Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review / A. Ullah, S. Heng, M. F. H. Munis [et al.] // Environmental and Experimental Botany. 2015. Vol. 117. P. 28–40.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭНДОФИТНЫХ МИКРОБИОМОВ ЗАСУХОУСТОЙЧИВЫХ РАСТЕНИЙ ПОЛУПУСТЫННОЙ СТЕПИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

Е. П. Чижевская¹, В. К. Чеботарь¹, М. В. Худяева¹, А. А. Кичко¹,
Н. Г. Лапенко², Р. Д. Костицын², О. В. Хонина², И. А. Тихонович^{1,3}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, chizhewskaaya@arriam.ru

²Северо-Кавказский федеральный научный аграрный центр, Михайловск
lapenko31@yandex.ru

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург
i.tikhonovich@spbu.ru

Эндофиты могут оказывать благотворное влияние на растения за счет фиксации атмосферного азота, растворения питательных веществ почвы, синтеза фитогормонов и других природных продуктов, защищающих растений-хозяев от многих биотических и абиотических стрессов, включая засуху [Endophytes from ... , 2022]. Мы провели анализ эндофитного микробиома у трех различных видов растений, произрастающих в Нефтекумском районе Ставропольского края. Данный регион является полупустынной степью и относится к крайне жаркой и засушливой зоне: среднегодовое количество осадков составляет 384 мм, а летом температура на поверхности почвы может достигать 55–60 °С.

В качестве объекта исследований были собраны три вида засухоустойчивых и восстанавливающих после высыхания растений: верблюжья колючка обыкновенная *Alhagi pseudalhagi* (Bieb.) Fisch. (сем. Fabaceae), житняк пустынный *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link) Schult. (сем. Poaceae) и марь белая *Chenopodium album* L. (сем. Amaranthaceae). Основным подходом для сбора образцов был поиск мест, где изучаемые растения произрастают в одной точке, с одним и тем же почвенным составом. Растения были собраны в пяти точках отбора, таким образом всего было отобрано 15 образцов растений (по 5 образцов каждого вида) и 15 образцов ризосферной почвы из-под каждого растения.

Анализ микробиомов был проведен методом высокопроизводительного секвенирования с использованием платформы Illumina MiSeq (Illumina Inc., США). Сравнительный анализ микробиомов ризосферных почв всех 15 образцов не выявил существенных различий в составе микробных сообществ, что указывает на одинаковые условия произрастания всех растений.

В табл. 1 приведен основной (более 0,1 %) состав обнаруженных бактериальных фил в тканях поверхностно стерилизованных корней трех изучаемых растительных видов.

Таблица 1

Основные филы эндофитного микробиома корней, %

Филы	<i>A. pseudalhari</i>	<i>A. desertorum</i>	<i>C. album</i>
Actinobacteriota	19,0	30,3	36,5
Bacteroidota	9,3	7,0	11,2
Cyanobacteria	–	–	3,8
Firmicutes	10,6	5,4	1,2
Мухососсота	–	–	3,4
Patescibacteria	4,7	6,3	0,5
Planctomycetota	–	0,5	–
Proteobacteria	51,3	34,8	37,4
Verrucomicrobiota	0,3	0,8	0,3
Bacteria;unclassified	0,2	1,2	2,0
Unclassified	4,5	13,6	3,6

В эндофитном сообществе корней всех растений доминировали представители фил Proteobacteria, Actinobacteriota и Bacteroidota. У видов *A. pseudalhari* и *A. desertorum* также наблюдалось значительное количество представителей фил Firmicutes, Patescibacteria и неклассифицированных представителей. У растений *C. album* были обнаружены представители фил Cyanobacteria и Мухососсота, а у *A. desertorum* – представители филы Planctomycetota.

Сравнительный анализ показал, что основные (более 1 %) представители эндофитного микробиома у трех видов растений существенно различаются (табл. 2). Так, в микробиоме корней *A. pseudalhari* (верблюжья колючка) доминировали неклассифицированные Enterobacterales, а также виды *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Cutibacterium* и *Bacillus*. У житняка (*A. desertorum*) – неклассифицированные Pseudonocardiaceae и виды *Pseudomonas*, причем последние составляли более 19 % основного эндофитного сообщества корней. У мари (*C. album*) – неклассифицированные Micrococcales, а также виды *Streptomyces*, *Massilia* и *Tychonema*.

Существует гипотеза, что основным источником бактериального сообщества эндофитов растений является ризосферная почва [Kandel, Joubert, Doty, 2017]. Наши же результаты показали, что разные виды растений, выращенные в одной и той же почве, содержат кардинально различные эндофитные микробиомы. Таким образом, бактериальные эндофиты обладают специфичностью по отношению растениям-хозяевам. С одной стороны, это может быть связано с отличиями в «настройке» иммунной системы разных растительных видов. С другой стороны, может указывать на то, что растения способны направленно рекрутировать из почвы определенные виды бактерий, необходимые тому или иному растительному виду в тех или иных условиях.

Таблица 2

Основные (более 1 %) представители эндофитных бактерий корней растений

фи- лы	<i>A. pseudalhari</i>		<i>A. desertorum</i>		<i>C. album</i>	
	представители	%	представители	%	представители	%
Ac	<i>Cutibacterium</i>	6,2	Pseudonocardia е н/кл	6,7	Micrococcaceae н/кл	5,7
	<i>Pseudonocardia</i>	1,8	Kineosporiaceae н/кл	3,0	<i>Streptomyces</i>	3,9
	Micromonosporaceae н/кл	1,3	<i>Promicromonospora</i>	1,3	<i>Actinoplanes</i>	2,1
			Micromonosporaceae н/кл	1,3	Micromonosporaceae н/кл	1,3
		<i>Agromyces</i>	1,2			
B	<i>Pedobacter</i>	5,6	Microscillaceae н/кл	2,2	Chitinophagaceae н/кл	4,2
			Chitinophagaceae н/кл	1,1	<i>Hyumenobacter</i>	1,2
C					<i>Tychonema</i>	3,5
F	<i>Bacillus</i>	4,4	<i>Paenibacillus</i>	2,6		
			Planococcaceae н/кл	1,7		
P	Saccharimonadaceae н/кл	3,5	Saccharimonadaceae н/кл	3,8		
Pr	Enterobacterales н/кл	10,1	<i>Pseudomonas</i>	19,4	<i>Massilia</i>	3,8
	<i>Pseudomonas</i>	7,1			<i>Variovorax</i>	2,9
	<i>Devosia</i>	3,0			<i>Kushneria</i>	2,3
	<i>Acidibacter</i>	2,7			Oxalobacteraceae н/кл	2,3
	Allorhizobium- Neorhizobium- Pararhizobium- Rhizobium	2,7			Allorhizobium- Neorhizobium- Pararhizobium- Rhizobium	2,6
	<i>Achromobacter</i>	2,6				
	<i>Sphingomonas</i>	2,4			Comamonadaceae н/кл	2,0
	<i>Ralstonia</i>	1,2				
U			н/кл	4,0		

Обозначения. Фи́лы: (Ac) Actinobacteriota; (B) Bacteroidota; (C) Cyanobacteria; (F) Firmicutes; (P) Pa-tescibacteria; (Pr) Proteobacteria; (U) Unclassified. (н/кл) – неклассифицированные представители.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 23-66-10013

Литература

Endophytes from halotolerant plants aimed to overcome salinity and draught / V. K. Chebotar, E. P. Chizhevskaya, M. E. Baganova [et al.] // Plants. 2022. Vol. 11. Art. 2992.

Kandel S. L., Joubert P. M., Doty S. L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants // Microorganisms. 2017. Vol. 5. Art. 77.

ИННОВАЦИОННАЯ УПАКОВКА ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ПРОДУКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Т. В. Чубенко, А. Р. Борисова, Е. О. Рыцова

Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы
Москва, chubenko_tv@pfur.ru

Введение. Обеспечение качества и безопасности продукции животного происхождения – многогранный процесс, в котором немаловажную роль играют упаковочные материалы. Как известно, регуляторный процесс начинается с декларирования упаковки по ТР ТС 005/2011, где учитываются все требования регламента и таким образом подтверждается соответствие материалов. Однако, что если не просто стремиться к безопасности, но и пытаться извлечь максимальную пользу из упаковки?

Продукты животноводства, такие как мясо, молоко яйца, являются скоропортящимися и в значительной степени зависят от качества упаковочных материалов в вопросе срока их хранения. В данном обзоре упаковка из растительных компонентов будет рассмотрена в качестве потенциально эффективного инструмента для увеличения срока хранения продуктов животного происхождения и в качестве альтернативного метода использования побочных продуктов агропродовольственной промышленности.

Побочные продукты растительного происхождения. Использование природных биополимеров, таких как полисахариды, липиды и белки, в качестве основы для разработки биоразлагаемой упаковки привлекает все большее внимание ученых. Биупаковка может также содержать различные наполнители, такие как пластификаторы, наночастицы, эфирные масла, растительные экстракты, питательные вещества, антиоксиданты и антимикробные соединения.

Биоразлагаемые упаковочные материалы, изготовленные с использованием побочных продуктов растительного происхождения, могут стать инновационным подходом к преодолению проблем с утилизацией отходов в пищевой промышленности.

Некоторые растительные компоненты способны сохранять качество упакованных пищевых продуктов за счет высвобождения антимикробных и антиоксидантных соединений в пищевую матрицу.

При изготовлении пищевой упаковки и покрытий для свежих фруктов и овощей основной задачей является замедление проникновения газов, водяного пара и поддержание модифицированной атмосферы.

Полифенолы. Полифенолы известны своими антиоксидантными и антирадикальными свойствами. В случае с упаковкой они демонстрируют значительную активность в борьбе со свободными радикалами и улучшают барьерные свойства для кислорода [Valorization of apple ... , 2019]. В зависимости от строения молекулы среди них выделяют фенольные кислоты, стильбены, флавоноиды, лигнаны.

Косточки манго (*Mangifera indica* L.) богаты такими полифенолами, как мангиферин, галловая кислота и эллаговая кислота. Аналогичным образом, кожура граната (*Punica granatum* L.) содержит пуникалагин, галловую кислоту, эллаговую кислоту, ванилиновую кислоту, лютеолин и кофейную кислоту (Kumar, 2022)

Полисахариды. Биоразлагаемые упаковки на растительной основе, изготовленные из полисахаридов, обладают высокими газонепроницаемыми свойствами, но менее устойчивы к проникновению водяного пара и механической деформации. Наличие комплекса полисахаридов может улучшить механические свойства упаковки. В качестве их источника ряд исследований предлагает использование кожуры граната (*Punica granatum* L.), антибактериальная активность которой распространяется на *S. aureus*, *L. Monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus* и *Salmonella* [Santhosh, Debarshi, Preetam, 2021] Необходимо отметить, что экстракт кожуры граната в целом обеспечивает хорошую совместимость между частицами кожуры и матрицей и может улучшать структурные, механические и биохимические свойства, такие как содержание антиоксидантов и фенолов, а также антимикробную активность.

Белки. Растительные белки получают из природных источников: экстрагированных растений, полученные из отходов агропромышленного комплекса и побочных продуктов. Среди растительных белков зеины, клейковина и соевые белки наиболее часто используются при изготовлении пленок и упаковки. Компоненты обладают рядом преимуществ. Пленки и покрытия из белков не влагостойки.

Потенциальные риски. Проблемы, связанные с применением подобных материалов, включают низкую физическую стабильность пленок, сниженные механические свойства по сравнению с синтетическими пластиками и, что более важно, отсутствие политики регулирования [Plant protein-based ... , 2022]. Необходимо поиск решений, которые позволят извлечь максимум антибактериальных и антиоксидантных свойств из растительных компонентов, при этом добиться нужной структуры

Выводы. Использование побочных продуктов, безусловно, помогает агропромышленным предприятиям в области инфраструктуры и экономических перспектив, поскольку хранение и переработка отходов являются их основными проблемами.

Возобновляемые, недорогие и биоразлагаемые материалы, которые получают из нетрадиционных фракций фруктов, овощей, риса, бобовых и других растительных компонентов могут быть крайне полезны при производстве упаковочных материалов.

Литература

Plant protein-based food packaging films; recent advances in fabrication, characterization, and applications / M. Hadidi, S. Jafarzadeh, M. Forough [et al.] // Trends in Food Science & Technology. 2022. Vol. 120. P. 154–173.

Santhosh R., Debarshi N., Preetam S. Novel food packaging materials including plant-based byproducts: A review // Trends in Food Science & Technology. 2021. Vol. 118. P. 471–489.

Valorization of apple waste for active packaging: multicomponent polyhydroxyalkanoate coated nanopapers with improved hydrophobicity and antioxidant capacity / L. Urbina, A. Eceiza, N. Gabilondo [et al.] // Food Packaging and Shelf Life. 2019. Vol. 21. Art. 100356.

ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА ВНЕДРЕНИЕ *PESTOBACTERIUM VERSATILE*

Е. В. Шруб, А. В. Колубако, Н. А. Григорьева, Е. А. Николайчик

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
shrubkaterina@gmail.com

P. versatile является возбудителем заболеваний «черная ножка» вегетирующих растений и «мягкая гниль» клубней картофеля. Фитопатогены через гормональные сигнальные пути растений могут не только подавлять их иммунитет, но и изменять условия окружающей среды для оптимизации получения питательных веществ и ускорения колонизации растений. В процессе вегетации растений картофеля количественное соотношение гормонов в разных органах меняется, поэтому интересно выяснить, как заражение патогеном *P. versatile* отражается на экспрессии защитных генов в листьях и клубнях *Solanum tuberosum* и показать роль эффектора DspE системы секреции III типа патогена при заражении.

Были произведены инфильтрация листьев и заражение клубней *S. tuberosum* сорта Рогнеда суспензиями штаммов *P. versatile* JN42 (д. т.) и *P. versatile* VKE (мутант по эффектору системы секреции III типа DspE) в NaCl 0,85 % и при помощи ОТ-кПЦР измерена экспрессия защитных генов (рис.).

Оценка количеств транскриптов показала, что, предположительно, происходит снижение активной формы АБК при заражении *P. versatile* как в листьях, так и в клубнях *Solanum tuberosum*. На это указывает снижение экспрессии гена 9-цис-эпоксикаротиноиддиоксигеназы *NCED3* и оксидазы абсцизового альдегида *AAO3* (ферментов, отвечающих за биосинтез абсцизовой кислоты), а также возрастание экспрессии гена гидроксилазы абсцизовой кислоты *CYP707a1* (переводящей абсцизовую кислоту в неактивную форму). При этом стоит отметить, что такой эффект более выражен в клубнях.

Заражение патогеном *P. versatile* приводит к подавлению жасмонатной сигнализации в надземных и подземных тканях картофеля за счёт повышения экспрессии негативного регулятора жасмонат-зависимых генов *JAZ* вне зависимости от штамма.

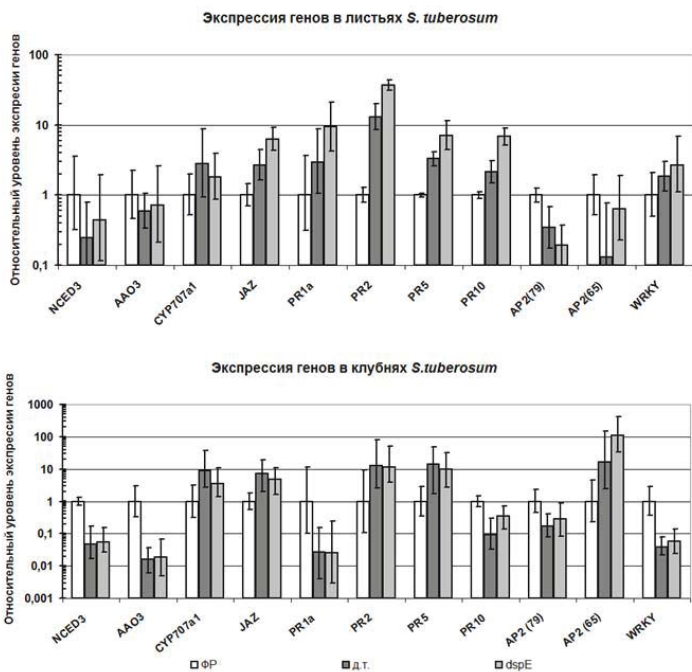


Рис. Относительные уровни экспрессии генов в листьях и клубнях растений *S. tuberosum* сорта Рогнеда при заражении патогеном *P. versatile* JN42 (д. т.) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант) в сравнении с раневым ответом (NaCl 0,85 % (ФР)). Показаны средние значения с 95%-ным доверительным интервалом

Также продемонстрировано различие в экспрессии защитных PR-генов при заражении патогеном клубней и листьев. Например, в листьях *S. tuberosum* в ответ на заражение *P. versatile* экспрессия защитных генов возрастает. Экспрессия конечного звена салицилатной сигнализации *PR1a* повышается, однако в случае заражения штаммом дикого типа эффект не очевиден (при трехкратной разнице средних значений 95 % доверительный интервал не позволяет с точностью говорить об изменениях в экспрессии), но при заражении *P. versatile* VKE экспрессия возрастает достоверно девятикратно по сравнению с контрольными растениями. Экспрессия генов *PR2* (в 10 и 40 раз), *PR5* (в 4 и 7 раз) и *PR10* (в 2 и 6 раз) возрастает при заражении штаммами *P. versatile* JN42 (д. т.) и *P. versatile* VKE (*dspE*-мутант). В клубнях наблюдается иная картина. В ответ на заражение патогеном происходит снижение экспрессии генов защитных белков *PR1a* и *PR10* в 33 и 10 раз соответственно, а гены *PR2* и *PR5* индуцируются в 10 раз вне зависимости от штамма.

Более того, было отмечена разница в экспрессии транскрипционных факторов этиленовой сигнализации в клубнях и листьях при внедрении *P. versatilis*. В листьях растений картофеля при заражении любым из вышеперечисленных штаммов патогена происходит снижение экспрессии гена транскрипционного фактора этиленовой сигнализации AP2(79). Ген другого транскрипционного фактора с доменом AP2(65) снижает экспрессию почти в 10 раз при заражении *P. versatilis* JN42, но экспрессия его восстанавливается при заражении *P. versatilis* VKE. В клубнях экспрессия AP2(79) при заражении меняется похожим образом. Однако экспрессия AP2(65), в клубнях наоборот возрастает от 10 до 100 раз при заражении *P. versatilis*. Ген транскрипционного фактора семейства WRKY в листьях незначительно индуцируется при заражении патогеном, в то время как в клубнях его экспрессия, наоборот, снижается примерно в 25 раз.

В листьях картофеля патоген *P. versatilis* с интактным эффектором DspE слегка снижает интенсивность индукции PR-генов. В клубнях и листьях растений картофеля паттерны экспрессии защитных генов отличаются: разнонаправленно меняют экспрессию в ответ на заражение гены транскрипционных факторов этиленовой сигнализации и WRKY, а также гены *PR1* и *PR10*.

Мы предполагаем, что вызываемое *P. versatilis* нарушение АБК- и жасмонат-зависимой сигнализации может способствовать повышению эффективности инфицирования растения-хозяина.

ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА ФИТОГОРМОНА АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

О. С. Юзихин¹, А. И. Шапошников¹, А. А. Бутин¹, Н. Б. Викторov²,
А. А. Камнев³, А. А. Белимов¹, Ю. В. Гоголев⁴

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, yuzikhin@gmail.com

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, kolkii@mail.ru

³Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН Саратов, a.a.kamnev@mail.ru

⁴Казанский научный центр РАН, Казань, gogolev.yuri@gmail.com

Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) играет важную роль в росте растений и их реакции на биотические и абиотические стрессовые факторы. Однако его накопление в почве может отрицательно влиять на прорастание семян, угнетать рост и повышать чувствительность растений к болезням. АБК является относительно химически стабильным соединением и устойчивым к гидролизу в ризосферных условиях. С другой стороны, его микробиологическая трансформация мало изучена. Ризосферный штамм *Rhodococcus* sp. P1Y ассимилирует АБК в качестве единственного

источника углерода и снижает концентрацию АБК в корнях растений [Abscisic acid ... , 2014]. Комплексом хроматографических методов были выделены и очищены промежуточные продукты разложения АБК этой бактерией. Подтверждением происхождения выделенных метаболитов из фитогормона явилось наличие в них радиоактивности при культивировании бактерий на меченой тритием АБК. Химические строение выделенных соединений было установлено комплексом физико-химических методов. Метаболиты были идентифицированы как дегидровимифолиол [Rhizosphere bacterium ... , 2021] и неопианное ранее соединение 1-гидрокси-2,6,6-триметил-4-оксо-2-циклогексен-1-уксусная кислота, названное родококковой кислотой [Rhizosphere bacterium ... , 2021; Isolation and characterization ... , 2022]. Предложен оригинальный метод синтеза родококковой кислоты, позволивший однозначно подтвердить структуру этого метаболита. Методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения были изучены динамики деградации АБК и накопления его метаболитов. Доказано, что дегидровимифолиол является предшественником родококковой кислоты в цепи метаболизма. Предложена схема деградации и ассимиляции АБК бактерией *Rhodococcus* sp. P1Y, предусматривающая постепенное укорочение ацильной части молекулы.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 24-16-00166).

Литература

Abscisic acid metabolizing rhizobacteria decrease ABA concentrations in planta and alter plant growth / A. A. Belimov, I. C. Dodd, V. I. Safronova [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. 2014. Vol. 74. P. 84–91.

Isolation and characterization of 1-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxo-2-cyclohexene-1-acetic acid, a metabolite in bacterial transformation of abscisic acid / O. S. Yuzikhin, A. I. Shaposhnikov, T. A. Konnova [et al.] // Biomolecules. 2022. Vol. 12. Art. 1508.

Rhizosphere bacterium *Rhodococcus* sp. P1Y metabolizes abscisic acid to form dehydrovimi-foliol / O. S. Yuzikhin, N. E. Gogoleva, A. I. Shaposhnikov [et al.] // Biomolecules. 2021. Vol. 11, N 3. Art. 345.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ В ДОЛИНАХ РЕК, ЛЕСАХ И СУБАЛЬПЬИНСКИХ ЛУГАХ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА

**А. П. Юрков¹, А. А. Крюков¹, А. О. Горбунова¹, Т. Р. Кудряшова¹,
А. И. Ковальчук¹, А. И. Горенкова²**

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, ap.yurkov@arriam.ru, aa.krakov@arriam.ru, a.gorbunova@arriam.ru, t.kudryashova@arriam.ru; a.kovalchuk@arriam.ru

²Санкт-Петербургский государственный университет, гСанкт-Петербург nastya.gorenkova.2016@mail.ru

Несмотря на то что грибы арбускулярной микоризы (АМ) играют важную роль во многих природных экосистемах, изучение их биоразнообразия до сих пор носит фрагментарный характер. Для того чтобы оценить, насколько оно может быть велико, необходимо оценить их видовое богатство в регионах с максимальной представленностью АМ-грибов. На территории Российской Федерации известен лишь один общепризнанный центр биоразнообразия растений и животных (biodiversity hotspot), которым является Кавказ [Biodiversity hotspots ... , 2000]. Можно предполагать, что видовое богатство грибов АМ также будет велико на Северном Кавказе. В связи с этим целью настоящего исследования было оценить молекулярно-генетическими методами видовое богатство грибов АМ в трех биотопах субальпийских лугов, трех биотопах лесов и трех биотопах речных долин Северного Кавказа. Ранее подобный анализ проводился лишь на уровне рода. Была применена разработанная и оптимизированная авторами методика идентификации АМ-грибов до уровня вида [Perspectives of using ... , 2020; The biodiversity of ... , 2024]. Для того чтобы охватить наибольшее разнообразие, отбор проб был проведен в конце лета – в августе, когда АМ грибов находилась в состоянии поздней фазы развития.

Проведена молекулярно-генетическая идентификация грибов с использованием ITS1 и ITS2 областей в качестве регионов баркодирования методом секвенирования Illumina MiSeq, анализа филогенетических деревьев для отдельных родов и поиска операционных таксономических единиц (ОТЕ) с идентификацией до уровня вида. В качестве референсных использовались последовательности из баз данных MaarjAM и GenBank NCBI. По результатам анализа более 10 млн прочтений была проведена оценка биоразнообразия грибов, в том числе грибов АМ. Выявлено 50 видов АМ-грибов, принадлежащих к 20 родам. Общее число видов грибов АМ (за исключением виртуальных таксонов) для биотопов субальпийского луга составило 24 и 19, для лесных биотопов – 22 и 13, для биотопов речных долин – 28 и 24 по регионам ITS1 и ITS2 соответственно.

Впервые показано, что центром биоразнообразия грибов АМ на Северном Кавказе являются речные долины, в том числе долина р. Теберда с

наибольшим разнообразием АМ-грибов (координаты стационарной пробной площади – 43°25'12.0" N 41°43'45.0" E; высота – 1342 м над у. м.). Корреляционный анализ (табл.) показал, что высокое биоразнообразие АМ-грибов в долинах рек может быть связано с более высоким процентом однолетних растений в этих биотопах, а также с менее кислыми почвами. Корреляций с общим числом видов травянистых растений и высотой над уровнем моря выявлено не было, за исключением отрицательной корреляции числа прочтений АМ-грибов по ITS2 с высотой.

Таблица

Наличие линейной корреляции между агрохимическими показателями почв, параметрами разнообразия растений и АМ-грибов

	Число видов травянист. растений	Доля однолетних растений	Высота н. у. м.	p _{H_{KCl}}	P _i
Число прочтений АМ-грибов по ITS1		*		*	*
Число ОТЕ АМ-грибов по ITS1				*	*
Число ОТЕ АМ-грибов по ITS1, определенных до вида (всего)		*		*	*
Число ОТЕ АМ-грибов по ITS1, определенных до вида без ВТ		*			*
Число видов АМ-грибов по ITS1				*	
Число видов АМ-грибов по ITS1 без ВТ					*
Число прочтений АМ-грибов по ITS2		*	**	*	
Число ОТЕ АМ-грибов по ITS2				*	*
Число ОТЕ АМ-грибов по ITS2, определенных до вида (всего)		*		*	
Число ОТЕ АМ-грибов по ITS2, определенных до вида без ВТ		*		*	
Число видов АМ-грибов по ITS2				*	

Примечание: ОТЕ – операционные таксономические единицы; ВТ – виртуальные таксоны; н. у. м. – над уровнем моря; P_i – содержание неорганического фосфора в почве; “*” и “**” – значимые (P < 0,05) положительные и отрицательные значения линейного коэффициента корреляции, соответственно. Серым цветом выделены ячейки таблицы для случаев, в которых не было выявлено достоверной взаимосвязи между параметрами.

Для того чтобы выявить особенности сезонной динамики грибов АМ в зависимости от развития АМ, был проведен также анализ биоразнообразия грибов АМ со сбором образцов почвы в начале июня на раннем этапе развития арбускулярных микориз. Число ОТЕ оказалось выше для экосистем субальпийского луга, главным образом за счет таких видов грибов, как *Acaulospora brasiliensis* и *Diversispora versiformis*. Тем не менее общее число видов грибов АМ (с исключением виртуальных таксонов) для биотопов субальпийского луга составило 9 и 2, для лесных биотопов – 10 и 5, для биотопов речных долин – 14 и 9 по регионам ITS1 и ITS2, соответственно. Общее число видов грибов АМ (без исключения виртуальных таксонов) для биотопов субальпийского луга составило 20 и 2, для лесных биотопов – 17 и 8, для биотопов речных долин – 45 и 18 по регионам

ITS1 и ITS2, соответственно. Таким образом, по результатам исследования подтвердилась гипотеза о том, что экосистемы речных долин обладают существенно более высоким видовым богатством АМ-грибов в сравнении с биотопами лесов и субальпийских лугов. Сопоставление биоразнообразия АМ-грибов речных долин Северного Кавказа с иными регионами, в том числе с мировыми центрами разнообразия, позволяет заключить, что нами найден первый центр разнообразия АМ-грибов в России.

Исследования выполнены с использованием оборудования центра коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 22–16–00064.

Литература

- Biodiversity hotspots for conservation priorities / N. Myers, R. A. Mittermeier, C. G. G. Mittermeier [et al.] // Nature. 2000. Vol. 403. P. 853–858.
- Perspectives of using Illumina MiSeq for identification of arbuscular mycorrhizal fungi / A. A. Kryukov, A. O. Gorbunova, E. M. Machs [et al.] // Vavilovskii Zhurnal Genet Selektsii. 2020. Vol. 24, N 2. P. 158–167.
- The biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in some ecosystems of the North Caucasus temperate hotspot / A. Yurkov, A. Kryukov, A. Gorbunova [et al.] // J. Fungi. 2024. Vol. 10, N 1. Art. 11. DOI: 10.3390/jof10010011.

БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS* В КОМПЛЕКСЕ С НАНОКОМПОЗИТАМИ ХИТОЗАНА КАК СТИМУЛЯТОРЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

Л. Г. Яруллина¹, Ж. Н. Калацкая², В. О. Цветков³, Г. Ф. Бурханова¹,
Н. А. Еловская², Е. И. Рыбинская², Е. А. Заикина¹, Е. А. Черепанова¹,
К. С. Гилевская⁴, В. В. Николайчук⁴

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского ФИЦ РАН, Уфа, yarullina@bk.ru

²Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь, kalatskaya@j@mail.ru

³Уфимский университет науки и технологий, Уфа, zv347@yandex.ru

⁴Институт химии новых материалов НАН Беларуси
Минск, Республика Беларусь, k_hilevskay@mail.ru

Современная концепция растениеводства базируется на инновационных ресурсосберегающих технологиях, обеспечивающих устойчивый рост продуктивности растений в изменяющихся климатических условиях. Одним из экологически чистых подходов к достижению указанных целей является использование бактерий, стимулирующих рост растений (PGPB). Важным звеном таких технологий может стать применение соединений на основе хитозана, так как они считаются активными активаторами имму-

нитета растений Meta-analysis of ... , 2022]. Показано, что хитозан может быть использован для повышения биологической активности микробиологических препаратов на основе штаммов рода *Bacillus* [PGPR in agriculture ... , 2021]. Однако существуют также трудности, связанные с включением хитозана в бактериальные питательные среды, поскольку он может подавлять рост бактериальной культуры из-за своей антимикробной активности, а также зависимости эффективности биопрепаратов от различных факторов окружающей среды, погодные условия и т. д. [Miljkovićb Marinković, Balešević-Tubić, 2020]. Введение новых функциональных групп и заместителей, например, низкомолекулярных фенольных соединений [Chemical Proprieties ... , 2021] позволяет создавать соединения на основе хитозана с улучшенными свойствами. Экспериментальные данные об иммуномодулирующем потенциале оксикоричных кислот в виде конъюгата с хитозаном, а также их взаимодействии с PGPB практически отсутствуют. Таким образом, значительный интерес представляет поиск и выяснение физиологических и молекулярных механизмов защитного и иммуностимулирующего действия новых нанопроизводных хитозана в комплексе с биологическими агентами на растения картофеля и повышение их устойчивости к возбудителям болезней и абиотическим стрессам.

Исследовали влияние конъюгата хитозана с кофейной кислотой (ХКК) в сочетании с *Bacillus subtilis* 47 на транскрипционную активность генов PR-белков и изменения протеома растений картофеля при заражении Y вирусом (YBK) и недостатке влаги. Механизмы повышения устойчивости растений картофеля к YBK и недостатку влаги были связаны с активацией транскрипции генов, кодирующих PR-белки: основной защитный белок (PR-1), хитиназа (PR-3), тауматин – подобный белок (PR-5), ингибитор протеазы (PR-6), пероксидаза (PR-9), рибонуклеаза (PR-10). Выявленная активация экспрессии маркерных генов системно приобретенной устойчивости (PR-1), и индуцированной системной устойчивости (PR-6) под влиянием совместной обработки *B. subtilis* с ХКК указывает на то, что у растений картофеля под их влиянием, формирование устойчивости к вирусной инфекции в условиях засухи протекает синергетически.

Методом двумерного электрофореза белков листьев *S. tuberosum* с последующим MALDI-TOF-анализом идентифицировано 12 белков, содержание и состав которых различался в зависимости от варианта опыта. Во всех растениях был обнаружен хлоропластный 20 кДа-шаперонин, относящийся к группе HSP-подобных белков. об исключительной важности шаперонинов для развития инфекционного процесса. В наших экспериментах наблюдалось существенное понижение содержания шаперонина в листьях относительно контроля под влиянием недостатка влаги. Также содержание этого белка понижалось при заражении Y-вирусом, особенно значительно в варианте обработки ХКК и *B. subtilis* + ХКК. По-видимому, одним из механизмов устойчивости растений является регуляция синтеза

белка, причем данный механизм задействуется как при биотическом, так и при абиотическом стрессе.

В вариантах обработки конъюгатом ХКК и в комбинации *B. subtilis* + ХКК наблюдалось подавление синтеза белка HSP70 (70 kDa heat shock-related protein), опосредующего межклеточный транспорт вирусов растений. Выявлено четыре белка оболочки вируса, которые (coat protein, polyprotein) интенсивно накапливались в листьях растений, зараженных Y-вирусом картофеля. Обработка ХКК снижала содержание этих белков в листьях, а в обработанных смесью *B. subtilis* + ХКК растениях вирусные белки совсем не выявлялись, как в условиях нормальной влажности, так и при недостатке влаги, что предполагает перспективность использования конъюгатов хитозана в сочетании с бактериями *B. subtilis* в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам различной природы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-16-00139 на оборудовании ЦКП «Биомика» УФИЦ РАН и ЦКП «Протеом человека» ЦНПО ИБМХ.

Литература

Chemical Proprieties of Biopolymers (Chitin/Chitosan) and Their Synergic Effects with Endophytic Bacillus Species: Unlimited Applications in Agriculture / R. Amine, C. Tarek, E. Hassane [et al.] // *Molecules*. 2021. Vol. 26, N 4. Art. 1117.

Meta-analysis of chitosan-mediated effects on plant defense against oxidative stress / H. Ji, J. Wang, F. Chen [et al.] // *Science of The Total Environment*. 2022. Vol. 851. Art. 158212. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158212.

Miljaković D., Marinković J., Balešević-Tubić S. The significance of Bacillus spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops, *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, N 7. Art. 1037. DOI: 10.3390/microorganisms8071037

PGPR in agriculture: A sustainable approach to increasing climate change resilience / A. Shah, M. Nazari, M. Antar [et al.] // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2021. Vol. 5. Art. 667546. DOI: 10.3389/fsufs.2021.667546

**III ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ»**

**Секция 4.1
МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
К ФАКТОРАМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

**СКРИНИНГ ГАЛОФИЛЬНЫХ И ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ
БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ СЕВЕРНОГО РАЙОНА
ПЕРМСКОГО КРАЯ, НА СПОСОБНОСТЬ К РОСТУ
ПРИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ**

**Л. Н. Ананьина¹, В. С. Алеев¹, Е. А. Шестакова¹,
А. А. Горбунов²**

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, ludaananyina@mail.ru

²Институт технической химии УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь

На территории промышленной добычи и переработки руд Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС) формируются условия для жизни солеустойчивых и галофильных бактерий [Ананьина, Kosheleva, Plotnikova, 2022]. Верхнекамье – северная часть Пермского края. В этом районе зимой отмечено промерзание грунтов [Василец, 2021]. В связи с этим целью настоящей работы было исследование галофильных и галотолерантных бактерий, выделенных ранее из почвы района солеразработки ВМКМС, на способность к росту при низкой температуре.

Для исследования были отобраны 13 штаммов бактерий. Среди них были галотолерантные бактерии родов *Bacillus* (3 штамма), *Microbacterium* (2 штамма), *Brevibacterium* (1 штамм), *Rhodococcus* (2 штамма), *Pseudomonas* (2 штамма), *Thalassospira* (1 штамм), а также галофильные бактерии родов *Salinicola* (1 штамм) и *Halomonas* (1 штамм). Изучение роста в условиях низких температур (0 и 5 °С) проводили, культивируя бактерии на плотной минеральной среде Раймонда [*Thalassospira permensis* sp. nov. ... , 2011], содержащей 2 % хлорида натрия и глюкозу в

конечной концентрации 1 г/л. Установлено, что 69 % исследованных штаммов бактерий росли при температуре 5 °С. Среди них были штаммы галотолерантных бактерий родов *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Thalassospira*, *Rhodococcus*, а также представители умеренно галофильных бактерий родов *Salinicola* и *Halomonas*. Три штамма бактерий, относящихся к роду *Brevibacterium* и роду *Rhodococcus*, росли при 0 °С. Ранее с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии было установлено, что клетки представителя рода *Rhodococcus* при низкой температуре накапливали эктоин [Ананьина, Шестакова, 2020]. В настоящем исследовании методом протонного магнитного резонанса выявлено, что клетки штамма *Rhodococcus* sp. SMB37 в условиях низкой температуры синтезировали трегалозу и эктоин.

Таким образом, полученные данные демонстрируют адаптацию отдельных штаммов бактерий, обитающих в экосистеме ВМКМС, к низким температурам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 24-26-20070.

Литература

Ананьина Л. Н., Шестакова Е. А. Галотолерантные бактерии класса *Actinobacteria* – продуценты осмопротекторных соединений (эктоина и гидроксиэктоина) // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Химическая технология и биотехнология. 2020. № 4. С. 257–261.

Василец Е. А. Условия промерзания почвы в Пермском крае // Географическое изучение территориальных систем : материалы XV Всерос. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. Пермь, 2021. С. 153–157.

Anan'ina L. N., Kosheleva I. A., Plotnikova E. G. Bacterial consortium as a model for studying the response of the microbial community of the Verkhnekamsk salt mining region to combined pollution // Theoretical and Applied Ecology. 2022. N 2. P. 116–123.

Thalassospira permensis sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium / E. G. Plotnikova, L. N. Anan'ina, V. I. Krausova [et al.] // Mikrobiologiya. 2011. Vol. 80. P. 691–699.

ПУТИ СОКРАЩЕНИЯ МЕТАГЕНОМИКИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЙ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Е. Е. Андронов¹, М. В. Семенов², А. А. Кичко¹, Н. Курчак¹,
Н. А. Проворов¹

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

²Почвенный институт им. В. В. Докучаева, Москва

В течение последних двух десятилетий происходил бурный рост исследований, связанных с анализом природных метагеномов. Среди природных сред особое место занимает почва, обладающая, по всей видимости, одним из самых сложных и больших метагеномов на Земле. Количество генетической информации, содержащейся в 1 г почвы и ее разнообразие исключительно велики: так по объему это примерно 10^{15} – 10^{16} пн (для масштаба приведем данные максимальном выходе у современных секвенаторов, которые приблизились к планке 10^{12} – 10^{13} н за запуск), а по количеству видов может достигать 10–20 тыс. К настоящему времени стало понятно, что природные микробиомы весьма пластичны и довольно быстро «откликаются» на изменения в окружающей среде. Из этого обстоятельства вырастает понятное желание использовать метагеномную информацию для анализа состояния среды, реализуя индикаторный потенциал ее микробиома. В сущности, именно тема связи таксономической или функциональной структуры природных микробиомов с факторами среды является одной из главных тем большинства мировых исследований микробиомов. Именно это имел в виду Бейеринк, более 100 лет назад высказавший идею о тесной связи микробиомов со средой (Everything is everywhere, the environment selects). Однако реальные исследования в этой области, особенно, в области анализа почвенных микробиомов сталкиваются с большими сложностями, а именно, с исключительными размерами метагеномов, стоимостью их секвенирования, невозможностью обеспечить секвенирование в достаточном количестве повторностей для обеспечения статистических критериев, требованием высокопроизводительных средств для их анализа и хранения (цена последнего скоро может превысить стоимость добычи), а еще и востребованностью для решения конкретных задач только небольшой фракции добытых данных. Если добавить к этому то обстоятельство, что исключительно высокое разнообразие почвенных микробиомов позволило прийти к пониманию того, что «универсальный почвенный метагеномный кор», по всей видимости, отсутствует, а набор общих таксонов уровня вида для всех почв России, может составлять всего несколько десятков, то становится понятно, что разработка практических метагеномных приложений для анализа состояний сред требует радикального сокращения. В представленном докладе будут приведены некоторые, как нам представляется, перспективные направления такого сокращения.

Работа поддержана грантом РНФ 23-16-000147.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

А. В. Ахова, А. Г. Ткаченко

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, akhovan@mail.ru, agtkachenko@iegmu.ru

Концентрация адениловых нуклеотидов и их соотношение, которое часто выражается в форме энергетического заряда, являются важными показателями, характеризующими общее состояние как прокариотических, так и эукариотических клеток [Chapman, Fall, Atkinson, 1971; Maldonado, Lemasters, 2014]. Изменение соотношения адениловых нуклеотидов является сигналом, регулирующим активность ферментов, топологию ДНК и посредством этого экспрессию генов, что отражается на всех протекающих в клетках процессах [Hsieh, Rouviere-Yaniv, Drlica ... , 1991; New insights on ... , 2011]. Ранее показано, что в ответ на воздействие бета-лактамных, фторхинолоновых и аминогликозидных антибиотиков в клетках бактерий наблюдается резкое временное повышение соотношения АТФ/АДФ, после чего следует увеличение внутриклеточной продукции активных форм кислорода [Akhova, Tkachenko, 2014]. Интересно исследовать является ли такое изменение энергетических показателей бактериальных клеток специфическим ответом на воздействие антибиотиков или представляет собой общий индикатор стрессовых состояний, вызванных воздействием различных физико-химических факторов.

Цель работы – исследовать изменение концентрации адениловых нуклеотидов в клетках бактерий, подвергнутых осмотическому и кислотному стрессам и воздействию этанола.

Объектом исследования является *Escherichia coli* RO91 [Lange, Hengge-Aronis, 1994]. Бактериальные клетки культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл минимальной среды M9 с добавкой 0,4 % глюкозы, при 37°C и скорости перемешивания 120 оборотов в минуту. Адениловые нуклеотиды экстрагировали 0,4 N хлорной кислотой из отмытых от среды культивирования клеток на ледяной бане в течение 25 мин и проводили их количественный анализ методом ВЭЖХ [Akhova, Tkachenko, 2014]. В качестве стрессоров использовали NaCl (осмотический стресс), уксусную кислоту (кислотный стресс) и этанол (моделирование теплового шока и стресса повреждения клеточной оболочки). Стрессоры вносили в культуру по достижении ею оптической плотности $OP_{600} = 0,3$ в сублетальных концентрациях, не вызывавших уменьшения количества колониеобразующих единиц (КОЕ) по сравнению с моментом добавки стрессора. Количество КОЕ определяли методом посева на твердые питательные среды.

В условиях осмотического стресса (50 г/л NaCl) происходило повышение концентрации АТФ с выделением двух пиков, первый из которых

наблюдался через 30 мин после начала стрессового воздействия, а второй – спустя три часа. Концентрация АДФ в этих условиях плавно возрастала на протяжении трех часов наблюдения, а затем резко снижалась по сравнению с нестрессированной культурой.

В ответ на внесение уксусной кислоты (1 г/л) на начальном этапе (15 мин) наблюдалось снижение АТФ, сменяемое незначительным (около 20 %) повышением уровня трифосфата после второго часа экспозиции бактерий. Концентрация АДФ в клетках, подвергнутых кислотному стрессу за все время наблюдения (4 ч) было ниже чем в контрольной культуре.

Воздействие этанола (7 %) вызывало плавное повышение АТФ на протяжении первого часа экспозиции, за которым следовало снижение концентрации трифосфата, уровень которого при этом оставался выше контрольного. Концентрация АДФ в этих условиях резко повышалась сразу после начала стрессового воздействия (15 мин), а затем снижалась и после первого часа ниже уровня контрольной культуры.

Несмотря на различные, иногда прямо противоположные изменения внутриклеточной концентрации АТФ и АДФ в условиях воздействия стрессовых факторов разной физико-химической природы, изменение соотношения АТФ/АДФ во всех исследованных стрессовых условиях было одинаковым. Воздействие этанола, уксусной кислоты и NaCl вызывало в бактериальных клетках увеличение соотношения АТФ/АДФ.

Таким образом, изменение внутриклеточной концентрации отдельных адениловых нуклеотидов зависит от типа физико-химического стресса, в то время как повышение соотношения АТФ/АДФ в бактериальных клетках наблюдается при всех исследованных типах стрессовых воздействий (осмотический стресс, кислотный стресс, воздействие этанола).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (124020500028-4 «Биоразнообразии микроорганизмов антропогенно загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды»).

Литература

- Akhova A. V., Tkachenko A. G. ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment // FEMS Microbiol. Lett. 2014. Vol. 353. P. 69–76.
- Chapman A. G., Fall L., Atkinson D. E. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation // J. Bacteriol. 1971. Vol. 108. P. 1072–1086.
- Hsieh L. S., Rouviere-Yaniv J., Drlica K. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 3914–3917.
- Lange R., Hengge-Aronis R. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability // Genes Dev. 1994. Vol. 8. P. 1600–1612.
- Maldonado E. N., Lemasters J. J. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect // Mitochondrion. 2014. Vol. 19. P. 78–84.
- New insights on transcriptional responses of genes involved in carbon central metabolism, respiration and fermentation to low ATP levels in *Escherichia coli* / S. Soria, R. de Anda, N. Flores [et al.] // J. Basic Microbiol. 2013. Vol. 53. P. 365–380.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ И ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ВОДЫ ХОЛОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЗАБАЙКАЛЬЯ

Т. Г. Банзаракцаева, Д. Д. Бархутова

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Улан-Удэ, tuwana_banz@mail.ru

Фундаментальные исследования показывают, что в холодных источниках активно развивается микробное сообщество, адаптированное к различным физико-химическим свойствам и условиям низких температур [Heterotrophic and Autotrophic ... , 2008; Microbial diversity ... , 2012; Bacterial diversity ... , 2019]. Однако влияние экологических условий на таксономический состав этих микробных сообществ малоизучено. Целью данного исследования было выявить корреляции между таксономическим разнообразием микробных сообществ и физико-химическими факторами воды трех холодных источников Забайкалья.

Для исследования были отобраны пробы воды из трех наземных выходов: 1) Дабан-Горхон – холодный железистый источник, расположенный на левобережье р. Уды, в 22 км от с. Сосново-Озерское (Еравнинский район, Бурятия); 2) Хангир – скважина № 27–72 в местности Хангир, 8,5 км восточнее с. Можайка (Еравнинский район, Бурятия); 3) Боргойский источник находится в 2 км южнее с. Белоозерск (Джидинский район, Бурятия).

Воды исследуемых источников характеризуются низкими температурами от 3 до 8 °С, слабощелочной реакцией среды (до 8,99) и низкой минерализацией (290–700 мг/л). По анионно-катионному составу воды источника Боргойский и Хангир относятся к гидрокарбонатным натриевым водам. Вода источника Дабан-Горхон является гидрокарбонатной кальциево-натриевой.

Таксономический состав микробного сообщества исследуемых холодных источников оценивали на основе профилирования по гену 16S рРНК. В исследуемом сообществе источника Хангир содоминировали представители двух филумов *Actinobacteriota* (53,5 %) и *Pseudomonadota* (класс *Alphaproteobacteria* 40,8 %). В сообществах Дабан-Горхон и Боргойский значительная доля последовательностей принадлежала бактериям классов *Gamma**proteobacteria* (29,8 и 52,2 % соответственно) и *Alphaproteobacteria* (15,6 и 16,6 % соответственно) филума *Pseudomonadota*. Также к доминантам были отнесены представители *Bacteroidota* (26,9 % в источнике Дабан-Горхон и 6,2 % в источнике Боргойский). Анализ микробных сообществ путем распределения на диаграмме Венна показал сходства и различия в таксономическом составе на уровне родов (рис.). В исследуемых сообществах были установлены три общих таксона *Brevundimonas*, *Nocardioides* и unclassified *Microbacteriaceae*. Характер-

но, что в микробном сообществе Хангир, кроме вышеуказанных таксонов, не было выявлено сходства по таксономическому составу с исследуемыми сообществами воды источников Дабан-Горхон и Боргойский.

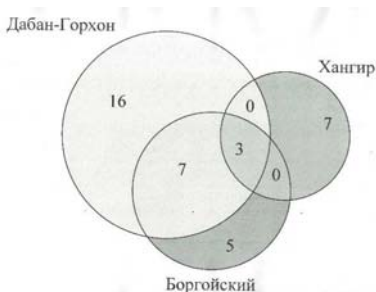


Рис. Общие и уникальные таксоны на уровне родов в микробных сообществах исследуемых холодных источников

Для выявления взаимосвязи факторов среды и состава сообществ на уровне родов, используя полученные данные по экологическим условиям местообитания и таксономическому составу микробных сообществ источников Дабан-Горхон, Хангир и Боргойский был проведен канонический анализ соответствий (ССА, canonical correspondence analysis). Полученные результаты свидетельствуют, что распространение бактерий большинства родов микробных сообществ Дабан-Горхон и Боргойский имеет положительную корреляцию с содержанием ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{3+} и F. Для бактерий, распространенных в сообществе воды источника Хангир наблюдается статистическая положительная связь с температурой, pH, минерализацией и содержанием $Na^+ + K^+$ и Cl^- .

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что таксономический состав микробных сообществ холодных источников Дабан-Горхон, Боргойский и Хангир положительно коррелируют с определенными экологическими условиями. Характерные особенности таксономического состава исследуемых сообществ вероятно обусловлены адаптационными способностями как на уровне бактерий отдельных таксонов, так и на уровне сообщества в целом.

Исследования выполнены в рамках темы госзадания «Микробные сообщества экстремальных природных экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотехнологический потенциал (№ госрегистрации 121030100229-1).

Литература

Bacterial diversity in Icelandic cold spring sources and in relation to the groundwater amphipod *Crangonyx islandicus* / R. Guðmundsdóttir, A. K. Kreiling, B. K. Kristjánsson [et al.] // PLoS One. 2019. Vol. 14, N 10. Art. e0222527.

Heterotrophic and Autotrophic Microbial Populations in Cold Perennial Springs of the High Arctic / N. N. Perreault, C. W. Greer, D. T. Andersen [et al.] // Applied and environmental microbiology. 2008. Vol. 74. P. 6898–6907.

Microbial diversity in two cold springs on the Qinghai-Tibetan Plateau / G. Li, H. Jiang, W. Hou [et al.] // Geoscience Frontiers. 2012. Vol. 3. P. 317–325.

РЕАКЦИЯ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ГОРЯЧИХ ИСТОЧНИКОВ БАЙКАЛЬСКОГО РЕГИОНА НА ИЗМЕНЕНИЕ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Д. Д. Бархутова, С. В. Зайцева, Е. В. Данилова, Е. В. Лаврентьева,
А. А. Раднагуруева, О. П. Дагурова

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Улан-Удэ, darima_bar@mail.ru

Наземные горячие источники являются экстремальными экосистемами, и в связи с постоянством химического состава и температуры являются удобными модельными системами для изучения экологии обитающих в них прокариот [Genomic and metagenomic ... , 2019]. Щелочные термальные источники представляют собой уникальные геотермальные местообитания, характеризующиеся высокой температурой и высокими значениями pH, которые создают благоприятные условия для развития термофильных и алкалофильных прокариот. Исследования микроорганизмов термальных местообитаний представляют большой интерес с точки зрения приспособленности бактерий к экстремальным физико-химическим параметрам окружающей среды, а также дают возможность применения многочисленных биоресурсов в промышленности и биотехнологии [Lewin, Wentzel, Valla, 2013].

Объектами исследования были 8 термальных источников (Баргузинская котловина – Гарга, Алла, Кучигер, Уро, Умхей, Горячинск, Восточные Саяны – Хойто-Гол, Жойгон). При выполнении исследования применялся комплекс гидрохимических, микробиологических, молекулярно-биологических и биоинформационных методов.

Наиболее высокотемпературные выходы обнаружены в гидротермах Гарга (73 °C), Уро (71 °C) и Алла (68 °C). Термальные воды характеризовались низкой минерализацией (до 1 г/л), щелочными значениями pH (8,2–10,1), за исключением углекислых источников Жойгон и Хойто-Гол (pH 7,1–7,3).

Сравнительный анализ состава доминирующих таксонов показал существенные различия в зависимости от места отбора (излив, горячий ручей) и типа пробы (вода, микробный мат и осадок) и выявил пространственную стратификацию сообщества. В сообществе высокотемпературных зон с температурой воды 61–73 °C выявлена высокая доля термофильных бактерий *Deinococcota*, которая в воде гидротерм Алла и Гарга

достигает 50 % от общего числа классифицированных последовательностей, в осадках гидротермы Уро – 20 %. Большинство *Deinococcota* представлено бактериями родов *Thermus* и *Meiothermus*. Группа включает термотолерантные виды, найденные в наземных и подземных горячих источниках, а также в горячих искусственных средах обитания. Также при высоких температурах выявлена весомая доля экстремально термофильных представителей филума *Aquificota*, которая достигает 10 % в воде гидротерм Гарга и Алла.

Особенностью гидротерм Баргузинской котловины является высокое обилие представителей филума *Acetothermia*, который является одной из глубоких ветвей домена *Bacteria*. Они обнаружены практически во всех типах проб, но максимального количества достигают в осадках гидротермы Алла (58 %). Также характерной особенностью высокотемпературных осадков является присутствие бактерий филума *Bacillota* (до 38 %). Следует отметить отличие микробного сообщества осадков гидротермы Уро, в котором доминировали *Armatimonadota* (35 %) (Уро 71 °С) и *Actinomycetota* (26 %) (Уро 62,1 °С).

При снижении температуры в осадках и воде начинают доминировать представители *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidota*, *Actinomycetota* (Умхей 43 °С, Кучигер 39 °С, Жойгон 36 °С).

В сообществе микробного мата высокотемпературной зоны (Алла 58 °С, Уро 61 °С) доминируют фототрофные бактерии *Chloroflexota*. Метаболическая гибкость различных представителей филы *Chloroflexota* определяет ее матообразующим компонентом во многих исследованных горячих источниках. При понижении температуры матообразующими микроорганизмами выступали представители *Cyanobacteria* (Алла 34,4 °С, Уро 52,1–55,7 °С, Гарга 55 °С, Горячинск 49,5 °С). В низкотемпературном мате гидротермы Алла (34,4 °С) не выявлены термофильные представители таких филумов как *Atribacterota*, *Nitrospirota*, *Deinococcota*, характерные для сообщества высокотемпературных матов.

В микробных матах субтермальных источников Восточного Саяна (Жойгон и Хойто-Гол) доминировали представители филумов *Pseudomonadota* (до 75 %), *Bacteroidota* (до 29 %) и *Bacillota* (до 21 %), внутри филумов таксономический состав варьировал. Установлено, что представители филумов *Pseudomonadota* и *Bacillota* обнаружены в широком спектре температур изученных гидротерм, что указывает на их широкий адаптационный потенциал.

Анализ условий обитания и их влияние на распространение микроорганизмов позволил выявить как группы, так и образцы с резко отличающимися параметрами. Данные по разнообразию 14 бактериальных филумов были включены в кластерный анализ, сравнительное обилие филумов архей суммировали под именем домена. Основными факторами, определяющими распределение образцов на основе сходства/различия экологи-

ческих и микробиологических характеристик, являлись минерализация, содержание ионов натрия, хлора и сульфатов, а также температура

Первый кластер объединил пробы из высокотемпературного сульфатного источника Гарга, отличающегося относительно высоким значением минерализации 0,9 г/л. Во второй кластер были объединены пробы мата источника Горячинск и донные осадки гидротермы Умхей со сходными гидрохимическими и температурными условиями. Третий кластер объединил пробы микробного мата из источника Хойто-Гол и воды источника Кучигер; эти источники характеризуются схожим гидрокарбонатно-сульфатным типом воды.

Обособленное положение имел образец микробного мата углекислого источника Жойгон, имеющего карбонатный тип воды с высоким содержанием кальция и натрия. Это обусловлено отличием характеристик данного источника от других гидротерм. Образцы из разных температурных зон гидротерм Алла и Уро образовывали отдельный большой кластер. Выявлены некоторые таксоны, разнообразие и численность которых, в большей степени ответственны за сходство/различие состава микробных сообществ – *Aquificota* и *Gammaproteobacteria*. Не обнаружено кластеризации образцов по биотопам (вода, микробные маты и осадки).

Таким образом, выявлены закономерности распространения микроорганизмов в термальных источниках Байкальского региона. Установлено, что гидрохимические условия в большей степени, чем микробное разнообразие на уровне филумов, определяют сходство/различие между образцами. В термальных и субтермальных источниках основными факторами, определяющими разнообразие сообщества, являлись минерализация, содержание ионов натрия, хлоридов и сульфатов, а также температура.

Исследования выполнены в рамках темы госзадания «Микробные сообщества экстремальных природных экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотехнологический потенциал (№ госрегистрации 121030100229-1

Литература

Genomic and metagenomic insights into the microbial community of a thermal spring / R. Pedron, A. Esposito, I. Bianconi [et al.] // Microbiome. 2019. Vol. 7, N 1. Art. 8. DOI: 10.1186/s40168-019-0625-6

Lewin A., Wentzel A., Valla S. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments // Curr. Opin. Biotechnol. 2013. Vol. 24. P. 516–525.

РИЗОСФЕРНАЯ МИКРОФЛОРА ЗЛАКОВ И ДВУДОЛЬНЫХ ТРАВ, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ ЗОЛОТВАЛЫ

А. А. Бетехтина, О. А. Некрасова, А. В. Малахеева,
О. В. Воропаева, М. Г. Малева

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина,
Екатеринбург, a.a.betekhina@urfu.ru

На современном этапе развития рекультивации земель, нарушенных в результате деятельности по добыче и переработке полезных ископаемых, необходимо понимание процессов и механизмов формирования растительности в связи с функциональными особенностями ризосферного микробиома [Cross, Aronson, 2023]. Примером техногенного субстрата является зола, образующаяся при сжигании электростанциями угля и складированная в золоотвалы, которые занимают большие площади в мире [Maiti, Pandey, 2020]. В условиях золоотвалов поступление азота, необходимого растениям-пионерам, главным образом осуществляется за счет деятельности свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов, заселяющих ризосферу этих растений [Zhan, Sun, 2012].

Пионерные небобовые двудольные растения, отличающиеся повышенным содержанием азота в листьях [Gusewell, 2004], могут компенсировать потребность в этом элементе либо за счет увеличения численности азотфиксаторов, либо за счет повышенной эффективности азотфиксации в ризосфере. У злаков концентрация азота в листьях значительно ниже [Gusewell, 2004], что, вероятнее всего, связано со слабым участием ризосферных азотфиксаторов.

Целью работы было оценить содержание азота (N) и фосфора (P) в субстратах разновозрастных золоотвалов и сравнить с численностью азотфиксирующих, фосфатсольбилизирующих и ИУК (индолил-3-уксусная кислота)-продуцирующих бактерий в ризосфере у пионерных видов – *Alopecurus aequalis* Sobol. (лисохвост равный), *Ranunculus sceleratus* L. (лютик ядовитый), и позднесукцессионных видов – *Poa pratensis* L. (мятлик луговой), *Ranunculus auricomus* L. (лютик золотистый). Работы проведены на молодом (длительность зарастания 5–8 лет) и старом (длительность зарастания 53–56 лет) золоотвалах одной тепловой электростанции на Среднем Урале (Верхнетагильская ГРЭС, г. Верхний Тагил, Свердловская обл.). В молодых почвах установлена предсказуемая и объяснимая сукцессионная динамика N и P: за 53–56 лет содержание N возросло в 2,4–7,1 раза, а содержание P снизилось в 1,1–2,1 раза.

Общее количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) в ризосфере исследуемых видов была достоверно выше на старом золоотвале (в среднем почти в 6 раз), и значимо больше у двудольных трав по сравнению со злаками – в 2,7 и 1,7 раза, соответственно, на молодом и старом золоотвалах. Количество

мезофильных аэробных и факультативно анаэробных азотфиксирующих микроорганизмов (КМФАНАМ) было на порядок ниже по сравнению с их общим содержанием. При этом также обнаружены достоверные различия между двудольными травами и злаками (в среднем КМФАНАМ было в 6,1 раза выше у двудольных), однако возраст золоотвала оказывал достоверное влияние на количество азотфиксаторов только у лютиков – на молодом золоотвале их численность была в 1,6 раз выше, чем на старом.

Для выделения в чистые культуры и дальнейшего изучения были отобраны одиночные колонии, выросшие на безазотистой среде Эшби, отличающиеся по культуральным признакам. Было отобрано из ризосферы *A. aequalis* и *R. sceleratus* (молодой золоотвал) по 40 и 58 чистых культур, соответственно; из ризосферы *P. pratensis* и *R. auricomus* (старый золоотвал) – по 50 чистых культур.

Была проведена оценка выделенных на твердой питательной среде азотфиксирующих колоний ризобактерий на способность к солюбилизации недоступных форм фосфатов и продукции ИУК. Бактерии, обладающие способностью продуцировать PO_4^{3-} в пределах от 0 до 5 мг/л, считались неспособными к солюбилизации фосфатов; в диапазоне от 5 до 50 мг/л – обладающими слабой способностью; от 50 до 100 мг/л – высокой; и более 100 мг/л – очень высокой. Разновозрастные золоотвалы отличались по количеству фосфатсолюбилизирующих ризобактерий: на молодом золоотвале доля бактерий с высокой и очень высокой способностью была существенно выше, по сравнению со старым. При этом также наблюдались различия между злаками и лютиками, особенно на старом золоотвале, где у однодольного вида преобладали ризобактерии, неспособные к солюбилизации фосфатов или со слабой способностью.

Была также проведена оценка выделенных колоний на их способность к синтезу гормонов роста – ауксинов. Бактерии, продуцирующие ИУК в диапазоне от 0 до 5 мг/л, считались неспособными к ее синтезу; от 5 до 50 мг/л – с высокой способностью, и выше 50 мг/л – с очень высокой способностью. Отмечены существенные различия как между разновозрастными золоотвалами, так и между злаками и двудольными травами. На молодом золоотвале доля азотфиксаторов, способных к высокому и очень высокому синтезу ИУК, была существенно выше как у однодольного *A. aequalis*, так и двудольного *R. sceleratus* (в среднем, 56 % против 17 % на старом золоотвале). При этом у лютикового количества неспособных к синтезу ИУК ризобактерий было в 1,5 раза больше по сравнению с лютиком. На старом золоотвале также наблюдались некоторые различия между этими таксонами, особенно в количестве бактерий, способных к очень высокому синтезу ИУК – у *P. pratensis* они полностью отсутствовали.

Для уточнения выявленных закономерностей необходимо изучение большего числа видов однодольных и двудольных растений на разных малоплодородных субстратах.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-00248, <https://rscf.ru/project/24-26-00248>.

Литература

Cross A. T., Aronson J. Plant-soil-microbe interactions and drivers in ecosystem development and ecological restoration // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2023. Vol. 11. Art. 1216016. DOI: 10.3389/fevo.2023.1216016

Gusewell S. N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance // *New Phytologist*. 2004. Vol. 164, N 2. P. 243–266.

Maiti D., Pandey V. C. Metal remediation potential of naturally occurring plants growing on barren fly ash dumps // *Environmental Geochemistry and Health*. 2020. Vol. 43. P. 1415–1426.

Zhan J., Sun Q. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings // *Microbiological Research*. 2012. Vol. 167. P. 157–165.

ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТА ВЫРАЩИВАНИЯ И НОВОГО УДОБРЕНИЯ НА РАСТИТЕЛЬНЫЙ МИКРОБИОМ И УРОЖАЙНОСТЬ РАСТЕНИЙ САЛАТА *LACTUCA SATIVA*

Г. Ш. Галиева, Н. В. Данилова, П. А. Курынцева,
П. Ю. Галицкая, С. Ю. Селивановская

Казанский (Приволжский) федеральный университет
Казань, goolnaz0708@gmail.com

Растения в процессе роста обогащают свой микробиом в основном из субстрата произрастания. Растительный микробиом напрямую влияет на функционирование растений, в частности их урожайность, и вопросы, связанные с его составом и свойствами, являются актуальными. В данной работе провели оценку влияния нового микроудобрения на основе нового биоразлагаемого хелатного комплекса глутамин-N,N-диуксусной кислоты (ГЛДА) на ростовые характеристики растений и на эндофитный микробиом растения салата латук *Lactuca sativa* L, выращенных на двух различных субстратах почве и гидропонике.

В начале оценили степень биоразложения хелатного комплекса на основе ГЛДА, с учетом биотической и абиотической деградации. Степень деградации микроудобрения на основе ГЛДА на 28-е сут. составила – 59,8 %, что подчеркивает потенциал ГЛДА, как экологически безопасной альтернативы традиционным хелатирующим агентам, таким как ЭДТА.

В ходе работы было заложено два вегетационных эксперимента по выращиванию салата, в которых в качестве субстрата в первом варианте использовали гидропонный раствор, во втором варианте почву. В почвенном эксперименте подкормку хелатными удобрениями осуществляли в двух вариантах – вносили под корень и опрыскивали листовую поверхность растений. В конце экспериментов провели оценку морфометрических и физиологических показателей салата. Учитывая ключевую роль

эндофитных бактериальных сообществ в здоровье растений и их потенциал в качестве индикаторов реакции растений на внешние воздействия, был проанализирован состав эндосферных сообществ растений, выращенных с внесением хелатных удобрений и соответствующих контролей.

Было установлено, что применение удобрений на основе ГЛДА положительно влияло на рост и развитие растений салата. Как в почве, так и в гидропонных системах, растения, обработанные ГЛДА-хелатами, демонстрировали увеличение длины и биомассы корней и листьев по сравнению с контрольными группами. Наиболее заметный положительный эффект наблюдался в отношении биомассы надземной части растений: увеличение в 4,6 раза в гидропонике и в 1,5–1,8 раза при обработке корней и листьев в почве, относительно соответствующих контролей. Содержание хлорофилла в листьях также значительно увеличилось в гидропонных системах, что свидетельствует об улучшении эффективности фотосинтеза и общего состояния растений.

В исследовании также изучалось влияние удобрения на основе ГЛДА на сообщества эндофитных бактерий в растениях салата. С помощью секвенирования ампликонов 16S рРНК были выявлены изменения в составе и разнообразии этих сообществ. Как в гидропонных, так и в почвенных растениях доминирующими бактериальными филами были *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, а в эндодитах листьев гидропонных растений также преобладали *Firmicutes*. Использование удобрения привело к уменьшению количества операционных таксономических единиц (ОТЕ) в бактериальных сообществах, что указывает на потенциальное упрощение или разрежение микробиома. В эндофитном микробиоме салата, выращенного на гидропонике количество ОТЕ в контрольных и в образцах, обработанных ГЛДА составило 45 и 24 в листьях и 258 и 272 в корнях растений, соответственно. В эндофитном микробиоме растений, выращенных на почве количество ОТЕ в листьях и корнях, составило 100, 115 и 110 и 270, 198 и 220 в контроле и в образцах с удобрением при корневой и внекорневой обработке соответственно. Однако изменения, вызванные использованием ГЛДА-хелатами, менее значительны по сравнению с другими факторами, влияющими на сообщества эндофитов. По результатам неметрического многомерного шкалирования (NMDS-анализа) и анализа индикаторных видов (ISA), основным фактором, формирующим эндофитные микробные сообщества растений салата, определен субстрат культивирования (почва или гидропоника). Вторым значимым фактором, влияющим на эндофитное сообщество является часть растения (надземная или подземная). Добавление хелатных микроэлементов, ускоряющее рост растений, является лишь третьим фактором, влияющим на состав микробного сообщества.

Таким образом, проведенное исследование показало, что ГЛДА является эффективным и экологически безопасным хелатирующим агентом, который улучшает рост салата и влияет на сообщества эндофитных бактерий. Высокая биоразлагаемость и положительные агрономические эффекты делают его перспективным кандидатом для устойчивого сельского хозяйства.

АДАПТИВНАЯ СЕЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ К БИОТИЧЕСКИМ И АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ КАК ОСНОВА СОЗДАНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Е. М. Глушень, И. А. Ровенская

Институт микробиологии НАН Беларуси
Минск, Республика Беларусь, gem@mbio.bas-net.by

Основой создания высокоэффективных биопрепаратов для очистки сточных вод, рекультивации загрязненных почв и акваторий является поиск микроорганизмов, обладающих не только высокой деструктивной активностью по отношению к токсикантам, но и способных осуществлять данную деструкцию при различных условиях окружающей среды. Важно учитывать огромное количество таких факторов как концентрация и многокомпонентность загрязняющих веществ, температура, кислотность и минерализация среды, наличие ростовых факторов, питательных веществ и т. д. В связи с этим обязательным этапом создания эффективных биотехнологий очистки загрязненных объектов является адаптации микроорганизмов к условиям, в которых они будут применены, в том числе и к стрессовым.

В последние годы все более широкое распространение получил метод интенсификации очистки сточных вод, основанный на внесении в очистные сооружения бактериальных культур, прошедших селекцию и предварительную адаптацию к основным загрязнителям сточных вод. Институт микробиологии НАН Беларуси разработан ряд биопрепаратов, направленных на очистку коммунально-бытовых и производственных сточных вод. При создании данных биопрепаратов первым этапом является адаптация отобранных микроорганизмов к высоким концентрациям токсикантов, которые могут наблюдаться в условиях залповых сбросов на очистных сооружениях. Так, сравнительный анализ эффективности утилизации высоких концентраций толуола и ксилола (2,5–10 об %) адаптированными и неадаптированными штаммами, входящими в состав биопрепарата БиоКиТ, показал, что предварительная адаптация культур позволяет значительно ускорить скорость деструкции токсикантов. На 7-е сут. исследования разница в степени деструкции толуола адаптированными и неадаптированными культурами составляла от 3,1 до 11,5 %, ксилола – от 10,0 до 19,2 % [Микроорганизмы-деструкторы ... , 2020]. Для биопрепаратов, предназначенных для очистки коммунально-бытовых сточных вод эффект от применения адаптированных культур на 15–54 % выше, чем от применения штаммов, не проходящих адаптацию.

Основной проблемой нарушения работы очистных сооружений является поступление в городскую канализацию большого количества неочи-

шенных производственных стоков разнопрофильных промышленных предприятий. Поступление стоков от данных предприятий в зависимости от производственных циклов, как правило, составляет от 5 до 40 % от общего стока. В данных сточных водах содержатся высокие концентрации широкого спектра загрязнений, в том числе биологически трудно окисляемых, а pH может варьировать в широком диапазоне и зачастую достигает 12. Производственные сточные воды, попадая на городские очистные сооружения, значительно снижают эффективность очистки сточных вод, а порой полностью ее исключают. Внесение биопрепаратов, предназначенных для увеличения эффективности очистки коммунально-бытовых сточных вод, в таких случаях зачастую является не эффективным в силу не приспособленности штаммов, входящих в состав препаратов, к критическим значениям pH и многообразию ксенобиотиков, поступающих на городские очистные сооружения в составе производственных сточных вод. Данная проблема решается за счет многоступенчатой адаптации микроорганизмов как к смеси токсикантов, так и кислотности среды. Так, добавление в процессе культивирования штаммов препаратов серии Антойл и Деаммон токсикантов, свойственных производственным сточным водам, а также защелачивание питательной среды позволило не только увеличить эффективность очистки коммунальных сточных вод на 15–38 %, но и поддерживать высокую эффективность очистки (не менее 85 %) по всем нормируемым показателям в условиях залповых сбросов производственных стоков.

Биоценоз активного ила под влиянием вносимых микробных препаратов подвергается перестройке в силу взаимодействия с интродуцируемыми штаммами бактерий. Эффект от внесения биопрепаратов может быть как положительный, так и отрицательный. Обязательным условием для успешной работы биопрепаратов является проверка их влияния на биоценоз активного ила, его седиментационные и окислительные свойства. Бесконтрольное применение препаратов, не прошедших такую проверку, зачастую приводит к вздуванию активного ила и является причиной его частичной или полной гибели. Однако данный процесс не может быть односторонним и сам активный ил является одним из факторов, влияющим на эффективность применения биопрепаратов. Так, большое количество нитчатых прокариот, обладающих большой скоростью утилизации легких органических субстратов, может негативно влиять на интродуцированные микроорганизмы, характеризующиеся медленным запуском ферментативной системы. В результате бактерии вносимых препаратов не могут закрепиться в биоценозе активного ила и, как следствие, отмечается отсутствие положительного эффекта от их применения в работе биологических очистных сооружений. Для решения данной проблемы в состав препаратов рекомендуется вводить штаммы, продуцирующие метаболиты, угнетающие развитие нитчатых прокариот, либо культуры, полученные методом предварительной адаптации к тем загрязняющим веществам, которые содержатся в очищаемых сточных водах.

Применение импортных биопрепаратов для ремедиации загрязненных почв и грунтов в условиях Беларуси зачастую является неэффективным, так как микроорганизмы, входящие в их состав, не адаптированы к местным почвенно-климатическим условиям. В связи с этим в состав препаратов рекомендовано включать штаммы микроорганизмов-деструкторов, выделенные из местных источников либо адаптированные к таковым. Так, в состав биосорбционного препарата Родобел-ТН входит штамм *Rhodococcus* sp. G13. Данный штамм выделен из образца дерново-подзолистой почвы на территории Минской области, а также обладает высокой степенью устойчивости к высоким температурам в условиях критически низкой влажности, сохраняет метаболическую активность в диапазоне температур 10–40 °С, способен к активному росту в среде с концентрациями NaCl, равными 5–30 г/л, и pH 5,0–12,0 [Шавела, Глушень, 2023]. Данные факты свидетельствуют о достаточно высокой солеустойчивости и адаптивности бактерий к условиям окружающей среды, что обеспечивает им эффективную деструкцию нефти и нефтепродуктов.

Последовательная адаптивная селекция микроорганизмов-деструкторов к биотическим и абиотическим факторам позволяет обеспечить высокую эффективность биопрепаратов и является неотъемлемой частью создания конкурентоспособных биотехнологий для охраны окружающей среды.

Литература

Микроорганизмы-деструкторы ксилола и толуола: адаптивная селекция и деструктивный потенциал / Е. М. Глушень [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. Минск : Беларуская навука, 2020. Т. 12. С. 414–422.

2. Шавела Ю. В., Глушень Е. М. Устойчивость бактерий *Rhodococcus* sp. G13 к неблагоприятным условиям среды // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. Минск : Беларуская навука, 2023. Т. 15. С. 559–569.

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА НА ДЫХАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS*, ВЫЗЫВАЮЩЕЙ КОЛЬЦЕВУЮ ГНИЛЬ КАРТОФЕЛЯ

И. А. Граскова, И. М. Романова, А. С. Мориц, А. И. Перфильева

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, Graskova@sifibr.irk.ru

Возбудитель кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*). Как правило, эти бактерии представляют собой прямые или слегка изогнутые палочки размером 0,4–0,75, 0,8–2,5 мкм, неправильной формы и часто клино- или булавовидной формы, преимущественно одиночные, но часто в парах V-образной конфигурации и иногда расположенные полисадно. Это облигатные аэробы, которые растут

медленно, нуждаются в богатых питательных средах и некоторых факторах роста. Они являются хемоорганотрофами, с метаболизмом дыхательного типа и образованием небольшого количества кислоты из маннитола, сорбитола, глюкозы, у некоторых штаммов – из маннозы; каталазоположительные, оксидазоотрицательные, индол не образуют, нитрат не восстанавливают.

Возбудитель по своей патогенности является узкоспециализированным и поражает представителей семейства *Solonaceae*, как правило, картофель. Бактерии рода *Clavibacter* способны использовать в качестве источника углерода целлюлозу. Целлюлоза является структурным компонентом клеточных стенок растений, представляет собой линейный гомополимер, состоящий из остатков D-глюкозы, связанных между собой β -1,4-гликозидными связями. Гидролиз целлюлозы катализирует целлюлаза, принадлежащая к семейству гликозилгидролаз. В качестве достойной альтернативы имеющимся малоэффективным методам борьбы с *Cms* могут выступать новые Se⁰-содержащие наноконпозиты, объединяющие известную выраженную антимикробную активность селена, а также водорастворимость и биодоступность, мембранотропность определяемые используемым в качестве стабилизирующей матрицы полисахаридом арабиногалактаном. Для выявления механизма подавления наноконпозитами селена жизнеспособности бактерий было изучено изменение интенсивности поглощения кислорода клетками *Cms* после обработки наноконпозитами [Граскова, 2022].

Для выявления механизма подавления наноконпозитами селена жизнеспособности бактерий было изучено изменение интенсивности поглощения кислорода и изменение флюоресценции в клетках *Cms* после обработки наноконпозитами. Выявлен подавляющий эффект на дыхание у наноконпозита с содержанием селена. Показано изменение мембранного потенциала бактериальной клетки при действии красителя TMRM: липофильные зонды красителя проникают через билипидные мембраны и накапливаются в областях с высокой концентрацией протонов, изменяя интенсивность флюоресценции клеток. Если концентрация протонов снижена, то наблюдается исчезновение флюоресценции этого красителя, что и позволяет отличить живые клетки от клеток, в которых произошел запуск апоптоза.

Полученные результаты позволяют рассматривать наноконпозит селена и арабиногалактана в качестве экологически безопасного агента для оздоровления сельскохозяйственных растений от патогенных бактерий.

Литература

Граскова И. А. Наноконпозиты как эффективный и безопасный способ борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : сб. тезисов докладов II Всерос. науч. конф. с Междунар. участием. Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г. Иркутск : Изд-во ИГУ, 2022. С. 214–216.

ДИНАМИКА РОСТА И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РЕКИ СЕЛЕНГИ, ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

О. П. Дагурова¹, А. В. Замбалаев², А. А. Раднагуруева¹

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Улан-Удэ, dagur-ol@mail.ru

²Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова
Улан-Удэ, ari.zambalaev@mail.ru

Микроорганизмы играют важную роль в функционировании водных экосистем, отвечая, главным образом, за процесс деструкции органического вещества, осуществляемый органотрофными бактериями. Органотрофные бактерии р. Селенги – главного притока оз. Байкал – трансформируют органические соединения, способствуя самоочищению и поддержанию качества вод. Изучение физиологических характеристик бактерий, выделенных из природных местообитаний, важно для оценки особенностей функционирования природного микробного сообщества, а также адаптивного и биотехнологического потенциала изолятов. Культивируемые бактерии ранее изучались в дельте Селенги и придельтовых районах оз. Байкал [Микробиологическая характеристика ... , 1998; Изучение видового ... , 2006; Бельх, Суханова, Белькова, 2013; Дагурова, Гаранкина, Белькова, 2018].

Целью работы было охарактеризовать динамику роста и динамику протеолитической активности чистых культур органотрофных бактерий, изолированных из воды р. Селенги, при различных температурах культивирования.

Для эксперимента было отобрано 5 штаммов органотрофных бактерий, ранее изолированных из проб воды р. Селенги, отобранных около г. Улан-Удэ. Штаммы были отнесены к видам: *Pseudomonas fluorescens* (штамм С8), *Pseudomonas syringae complex* (штамм С18), *Bacillus altitudinis/pumilus* (штамм С4), *Bacillus cereus* (штаммы С19 и С20). Выделенные бактерии являются представителями филумов *Pseudomonadota* и *Bacillota*, широко распространенных в микробных сообществах водных экосистем. Эти таксоны бактерий легко культивируются, составляют значительную часть культивируемого микробного сообщества различных биотопов оз. Байкал и дельты Селенги, демонстрируют широкое метаболическое разнообразие [Изучение видового ... , 2006]. Выделенные культуры были способны утилизировать широкий спектр сахаров, спиртов и органических кислот.

Культивирование проводили при температурах 4 °С, 30 °С и 40 °С на минеральной среде Пфеннига с белковым субстратом триптоном в количестве 1,5 %. Также параллельно определяли протеолитическую активность штаммов при тех же температурах на субстрате азоказеине.

Все изучаемые культуры показали быстрый активный рост при 30 °С, активное накопление биомассы происходило логарифмически до 4 сут.

роста, затем накопление биомассы стабилизировалось. При 40 °С рост также наблюдался у всех культур, но активное накопление биомассы происходило только после адаптивного периода в течение 3 сут. При 4 °С у штаммов рода *Bacillus* почти не было роста. Штаммы рода *Pseudomonas* отличались психротолерантностью: они были способны накапливать значительную биомассу при 4 °С после продолжительной лаг-фазы (6–7 сут.).

При 30 °С все изученные штаммы проявляли протеолитическую активность; максимальная активность отмечена на 2–3-е сут. Штамм С8 *Pseudomonas fluorescens* проявлял значительную протеолитическую активность (до 0,72 ед). При 40 °С также все штаммы проявляли протеолитическую активность с максимумом на 4-е сут. роста. Наиболее активен и стабилен был штамм С4 *Bacillus altitudinis/pumilus*. При 4 °С активность штаммов была невысока; максимум активности наблюдался на 7-е сут. культивирования. Наиболее активны были штаммы С8 и С20.

Таким образом, исследование физиологического роста и протеолитической активности изолированных из воды р. Селенги чистых культур бактерий показало, что наиболее активный рост и протеолитическая активность по азоказеину проявлялись при 30 °С. Изученные штаммы также проявляли протеолитическую активность при 40 °С и при 4 °С, что может свидетельствовать об адаптационном потенциале выделенных культур. Наиболее активно накапливали биомассу и проявляли ферментативную активность штаммы С8 *Pseudomonas fluorescens* и С18 *Pseudomonas syringae complex*, что делает их перспективными для возможного применения в биотехнологических целях.

Исследования выполнены в рамках темы госзадания «Микробные сообщества экстремальных природных экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотехнологический потенциал (№ госрегистрации 121030100229-1).

Литература

- Белых М. П., Суханова Е. В., Белькова Н. Л. Особенности культивируемых гетеротрофных микроорганизмов литоральной зоны озера Байкал // Известия ИГУ. Биология. Экология. 2013. Т. 6, № 3. С. 20–26.
- Дагурова О. П., Гаранкина В. П., Белькова Н. Л. Идентификация культивируемых органо-трофных бактерий прибрежно-соровой зоны озера Байкал // Вестник БГУ. Биология, география. 2018. № 2. С. 3–9.
- Изучение видового состава культивируемых гетеротрофных микроорганизмов оз. Байкал / В. В. Парфенова, Н. Л. Белькова, Л. Я. Денисова [и др.] // Биология внутренних вод. 2006. № 1. С. 8–15.
- Микробиологическая характеристика реки Селенга / Д. Д. Бархутова, В. Ш. Дондоков, Б. Б. Намсараев, В. С. Мологов // Вестник Бурятского университета. Серия 2: Биология. 1998. № 1. С. 33–40.

МОНИТОРИНГ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА СУХОЙ БИОМАССЫ БАКТЕРИЙ

В РАЗНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИИ МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

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

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Саратовский научный центр РАН», Саратов
jdyatlowa2013@yandex.ru, tugarova_anna@mail.ru, odissey94.sid@mail.ru
a.a.kamnev@mail.ru

Современный метод инфракрасной Фурье-спектроскопии (ИКФС) – один из наиболее широко используемых инструментальных методов, что обусловлено его высокой чувствительностью, относительной простотой и экспрессностью проведения измерений, а также применимостью к образцам, находящимся практически в любом физическом состоянии. В настоящее время он всё более активно используется и в микробиологических исследованиях, позволяя, помимо возможности идентификации микроорганизмов до уровня штаммов, также проследить как общие изменения биомакромолекулярного состава микробных культур, так и внутри- и межмолекулярные взаимодействия определенных функциональных групп в них [Applications of Fourier ... , 2023; Камнев, Тугарова, 2023]. В ряде наших предшествующих экспериментальных работ продемонстрирована возможность проведения сравнительного изучения планктонных культур и сформированных биопленок, а также анализа изменений, происходящих в клетках бактерий под влиянием различных стрессовых факторов [Poly-3-hydroxybutyrate ... , 2021; Fourier transform ... , 2023].

В данной работе с помощью метода ИКФС были проанализированы изменения, происходящие в макромолекулярном составе некоторых видов бактерий, имеющих практическое значение для агробιοтехнологии, в зависимости от их физиологического состояния. На основании разработанных и апробированных нами ранее (на примерах азоспирилл) методологических подходов [Poly-3-hydroxybutyrate ... , 2021; Fourier transform ... , 2021; Fourier transform ... , 2023] в высушенных биомассах проводился сравнительный анализ относительных интенсивностей полос определенных функциональных групп (валентные колебания $>C=O$ сложноэфирной группы поли-3-гидроксиалканоатов (ПГА), характеризующей их уровень накопления в клетках бактерий (в виде гранул); валентные $C-H$ колебания групп $>CH-$, $-HC=CH-$, $-CH_2-$ и $-CH_3$, включая алифатические цепи остатков жирных кислот липидов и липополисахаридов; характерные колебания полисахаридсодержащих макромолекул, белков и др.). Анализ спектроскопических данных с использованием математической обработки спектров (расчет вторых производных; аппроксимация спектров и расчет относительных площадей полос) для указанных типов характерных колебаний функциональных групп позволяет проводить неразрушающий мониторинг биомакромолекулярного состава клеток, изменя-

ющегося в ответ на условия культивирования и состояние клеточной биомассы. Особое внимание было также уделено превращениям, сопутствующим высушиванию (лиофилизации) бактериальных культур; при этом был проведён мониторинг редокс-превращений железа в клетках бактерий методом мёссбауэровской спектроскопии (как описано в работе [Diffuse reflectance ... , 2020]).

Полученные результаты показали перспективность указанной методологии при изучении биотехнологически важных превращений в клетках микробных объектов при изменениях физиологического состояния, в частности, при высушивании биомассы, что является одним из важнейших способов хранения живых микробных препаратов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 24-26-00209).

Литература

Камнев А. А., Тугарова А. В. Особенности методологии инфракрасной фурье-спектроскопии и интерпретации спектроскопических данных при анализе микробиологических объектов // Журнал аналитической химии. 2023. Т. 78, № 10. С. 914–928.

Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives / S. Tiquia-Arashiro, X. Li, K. Pokhrel [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. Art. 1304081.

Diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) and Mössbauer spectroscopic study of *Azospirillum brasilense* Sp7: Evidence for intracellular iron(II) oxidation in bacterial biomass upon lyophilisation / A. A. Kamnev, A. V. Tugarova, A. G. Shchelochkov [et al.] // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. Vol. 229. Art. 117970.

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: sample preparation effects / A. A. Kamnev, Yu. A. Dyatlova, O. A. Kenzhegulov [et al.] // *Molecules*. 2021. Vol. 26. Art. 1146.

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of biofilms formed by the rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245: Aspects of methodology and matrix composition / A. A. Kamnev, Yu. A. Dyatlova, O. A. Kenzhegulov, Yu. P. Fedonenko [et al.] // *Molecules*. 2023. Vol. 28. Art. 1949.

Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative *in-situ* FTIR spectroscopic analysis / A. V. Tugarova, Yu. A. Dyatlova, O. A. Kenzhegulov, A. A. Kamnev // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021. Vol. 252. Art. 119458.

РАЗЛОЖЕНИЕ ИМАЗАМОКСА В ПРИСУТСТВИИ СПЕЦИАЛЬНОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ БИОКОМПОЗИТ-ДЕСТРУКТ

С. Д. Каракотов¹, Е. В. Желтова¹, К. Н. Божко¹, Н. А. Балаева¹,
И. А. Алейник¹, Г. И. Вильданова¹

¹ АО «Щелково Агрохим», Щёлково, Россия

Имазамокс – один из распространенных гербицидов группы имидазолинонов, контролирующих широкий спектр сорных растений путем ингибирования фермента синтетазы ацетогидроксикислот (AHAS). Он применяется на бобовых, других культурах, устойчивых к действию имидазолиновых гербицидов, а также является основным гербицидом для системы Clearfield(R). [Государственный каталог ... , 2024] Однако в результате многолетнего применения имазамокса может происходить накопление его остатков в почвах, что отрицательно влияет на чувствительные культуры севооборотов. В настоящее время сохраняет актуальность разработка приёмов, способных снизить почвенное последствие имазамокса и других гербицидов [Применение микробных ... , 2023; Негативные эффекты ... , 2023]. Поскольку микробиологический путь деструкции имазамокса в почве является основным, то перспектива контроля загрязнения с помощью микробных композиций представляется наиболее экологичной [Применение микробных ... , 2023]. Биокomпозит-Деструкт – специализированное жидкое микробиологическое удобрение для ускоренного разложения соломы, пожнивных и органических остатков. Лабораторные биотесты показали способность препарата Биокomпозит-Деструкт разлагать имазамокс и снижать фитотоксическое действие гербицида в почве для чувствительной культуры-горчицы белой (*Sinapis alba*).

Для оценки способности Биокomпозит-Деструкт к разложению имазамокса в питательную среду 8E [Бактерии-деструкторы ... , 2019] добавляли имазамокс до концентрации 0,013 г/л, разливали в колбы по 100 мл и стерилизовали при 121 °С 15 мин. Далее колбы засевали 0,5 мл биопрепарата и инкубировали в шейкере-инкубаторе при 250–300 об/мин, 20 °С в течение 96 ч, до получения споровой суспензии. Контроль фаз жизненного цикла бактерий проводили с использованием микроскопии. Повторность опыта трёхкратная. После инкубирования измеряли концентрацию имазамокса в среде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенной фазе с ультрафиолетовым детектором.

Для проверки эффективности биодеструкции имазамокса был проведён лабораторно-вегетационный эксперимент на чувствительной тест-культуре. В 500 г почвенного субстрата (торф:земля:песок, 1:1:1) вносили по 3 мл инкубированной суспензии биопрепарата с гербицидом. В контрольный вариант вносили 3 мл водопроводной воды. Обработку проводили ручным опрыскивателем, почва тщательно перемешивалась и поме-

шалась в вегетационные сосуды. Посев горчицы белой проводили откалиброванными, предварительно пророщенными (20 °С 48 ч), семенами на глубину 3 см. Повторность четырехкратная. Выращивание проводили при температуре 22 °С, освещении 10000 Люкс и 70 % влажности почвы. Учёт биометрических данных проводили через 40 сут. после посева. Для оценки фитотоксичности имазамокса в почве учитывали всхожесть, длину побегов и сырую надземную массу растений. Полученные результаты подвергли стандартной статистической обработке [Дмитриев, 1995].

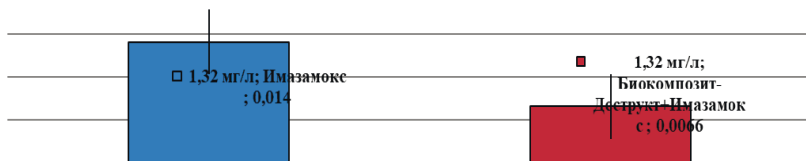


Рис. 1. Содержание имазамокса в среде после 96ч культивирования с микробиологическим препаратом Биокомпозит-Деструкт

Как показал анализ методом ВЭЖХ, в присутствии Биокомпозит-Деструкт, наблюдается существенное уменьшение имазамокса в среде, что позволяет говорить о потенциале компонентов микробиологического препарата адаптироваться к наличию гербицида как субстрата питания и способности его к деструкции имазамокса.

Таблица

Влияние на рост горчицы белой имазамокса после 96 ч культивирования с микробиологическим препаратом Биокомпозит-Деструкт

Вариант	Всхожесть, %	Средняя длина побегов 100 растений, см	Сырая биомасса 100 растений, г
Контроль (дист. вода)	85,0	23,1±0,5	134,7
Биокомпозит-Деструкт	87,5	29,1±0,4	156,2
Имазамокс	72,5	13,4±0,6	90,7
Имазамокс + Биокомпозит-Деструкт	85,0	25,2±0,7	140,2



Рис. 2 Опытные растения на 40-е сутки выращивания после посева в почву

Как показал биотест на горчице, Биокомпозит-Деструкт существенно снижает фитотоксическое последствие гербицида. Очевидно, что метаболиты, образующиеся в процессе микробиологического разложения имазамокса не вызывают отрицательного влияния на рост культуры. Из данных полученных в ходе исследования можно заключить, что препарат Биокомпозит-Деструкт обладает высоким адаптационным потенциалом для микробиологической деструкции имазамокса.

Литература

Бактерии-деструкторы гербицидов классов сульфонилмочевины и имидазолинонов / П. И. Орловская, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Н. И. Гирилович [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. Минск, 2019. Т. 11. С. 549–560.

Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. URL: <https://docs.cntd.ru/document/420235436> (дата обращения: 20.10.2023)

Дмитриев Е. А. Математическая статистика в почвоведении. М. : Изд-во МГУ, 1995. 320 с.

Негативные эффекты применения гербицидов группы имидазолинонов: Проблемы и решения / В. В. Бычкова, И. А. Сазонова, П. С. Пиденко [и др.] // Агрохимия. 2023. № 2. С. 87–96.

Применение микробных биотехнологий для устранения в почве остатков гербицидов классов имидазолинонов и сульфонилмочевин (обзор) / О. В. Колотова, Е. Э. Нефедьева, И. Р. Грибуст [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. 2023. № 4. С. 16–27.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РЯДУ ИНДОЛИЛБЕНЗИМИДАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ, ОБЛАДАЮЩИХ ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ АЛАРМОНСИНТЕТАЗ

**Н. М. Кашеварова¹, Е. Ю. Мендограло², Л. Ю. Нестерова^{1,2},
А. Г. Ткаченко^{1,2}**

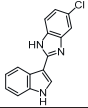
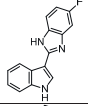

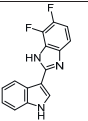
¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
Пермь, nkashev@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

Алармонсинтетазы – ферменты семейства RSH (RelA/SpoT Homologue), ответственные за синтез/гидролиз алармона (p)ppGpp – регулятора стринджен-ответа, формируемого в бактериальных клетках при стрессовых воздействиях, в частности, стрессе голодания. Ингибиторы алармонсинтетаз блокируют синтез (p)ppGpp, подавляя индуцируемые алармонами клеточные процессы, и проявляют слабую активность в отношении активно растущих бактериальных клеток экспоненциальной фазы роста. Однако они способны эффективно действовать при переходе культуры в стационарную фазу, когда увеличивается число медленно растущих и покоящихся клеток, включая антибиотикотолерантных персистеров [Inhibiting the stringent ... , 2019].

Поиск перспективных ингибиторов алармонсинтетаз проводили на базе библиотеки индолилбензимидазольных производных, синтезированных в лаборатории органического синтеза ПГНИУ. В качестве критерия поиска использованы значения минимальных ингибиторных (МИК) и минимальных бактерицидных концентраций (МБК) индолилбензимидазолов при их воздействии на культуры *Escherichia coli* и *Mycobacterium smegmatis* (МИК/МБК < 1000 мкг/мл) [Synthesis, antimicrobial ... , 2023]. Эффективность действия выбранных для исследования индолилбензимидазольных производных (табл. 1) со значениями МИК/МБК 125–250 мкг/мл оценивали по способности бактериальных культур формировать персистерные клетки к индолилбензимидазолам.

Таблица 1
 Антибактериальная активность исследованных индолилбензимидазолов

Обозначение	Название	Формула	МИК/МБК, мкг/мл	
			<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
1a	2-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)-5-хлор-1 <i>H</i> -бензо[<i>d</i>]имидазол		125/125	250/250
1б	2-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)-5-фтор-1 <i>H</i> -бензо[<i>d</i>]имидазол		125/125	250/250
1в	2-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)-7-метил-1 <i>H</i> -бензо[<i>d</i>]имидазол		250/250	125/125
1г	2-(1 <i>H</i> -индол-3-ил)-6,7-дифтор-1 <i>H</i> -бензо[<i>d</i>]имидазол		125/125	125/125

В качестве объектов исследования использованы штаммы *E. coli* BW25141 и *M. smegmatis* mc²155. Бактерии культивировали на минеральной среде M-9 с 0,4 % глюкозы (*E. coli*) или среде Middlebrook с добавлением 0,44 % глицерина и 0,05 % твина (*M. smegmatis*). С целью выявления ингибиторной активности изучаемых соединений по отношению к (p)ppGpp-синтетазам использованы также мутантные штаммы, несущие делеции генов, кодирующих алармонсинтетазы – $\Delta relA$, $\Delta relA\Delta spoT$ (*E. coli*) и Δrel_{Msm} , $\Delta rel_{Msm}\Delta sas$ (*M. smegmatis*). Пробы для определения количества персистеров, отобранные в экспоненциальных и стационарных культурах, подвергали действию изучаемыми соединениями в течение 24 ч с последующим высевом на чашки с LB-агаром для подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ), выросших после инкубации при 37° С в течение 24 (*E. coli*) и 72 ч (*M. smegmatis*) (табл. 2).

Таблица 2

Образование персистеров под действием индолилбензимидазолов в культурах родительских и мутантных по алармонсинтетазам штаммов *E. coli* BW25141 и *M. smegmatis* (\log_{10} КОЕ/мл)

Штамм	Iа		Iб		Iв		Iг	
	эксп	стац	эксп	стац	эксп	стац	эксп	стац
BW25141	8,33	1,96*	7,82	2,93*	6,59	2,27*	8,38	6,09*
BW25141 Δ <i>relA</i>	5,48	0*	0,5	0	0,81	0	2,59	1,08*
BW25141 Δ <i>relA</i> Δ <i>spoT</i>	3,32	0	1,24	0	0,36	0	2,34	0,74
<i>M. smegmatis</i>	9,12	5,32*	9,12	7,07*	4,91	1,40*	3,84	3,38
<i>M. smegmatis</i> Δ <i>rel</i> _{Msm}	8,60	6,04*	8,85	7,23*	4,46	2,11	4,38	2,83
<i>M. smegmatis</i> Δ <i>rel</i> _{Msm} Δ <i>sas</i>	8,07	5,23*	8,62	7,44*	1,39	1,14	3,88	1,94

В таблице представлены средние значения из серии однотипных экспериментов (не менее трех); эксп – экспоненциальная культура, стац – стационарная культура; * – статистически значимое отличие от экспоненциальной культуры соответствующего штамма ($p \leq 0,05$).

Установлено, что все исследованные индолилбензимидазолы оказывали ингибирующее действие на стационарные культуры изученных видов в сравнении с экспоненциально растущими бактериями, более выраженное в отношении штаммов *E. coli*. При этом делеция генов алармонсинтетаз (Δ *relA*, Δ *relA* Δ *spoT*) приводила к усилению ингибиторного эффекта всех изученных соединений на персистообразование *E. coli*, тогда как в культурах микобактерий снижение персистенции, обусловленное отсутствием алармонсинтетаз (Δ *rel*_{Msm}, Δ *rel*_{Msm} Δ *sas*), отмечалось только при воздействии одного производного (Iг). Это указывает на перспективность использования изученных индолилбензимидазолов в качестве ингибиторов алармонсинтетаз *E. coli*.

Литература

Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence / N. K. Dutta, L. G. Klinkenberg, M.-J. Vazquez [et al.] // Science Advances. 2019. Vol. 5, N 3. Art. eaav2104.

Synthesis, antimicrobial and antibiofilm activities, and molecular docking investigations of 2-(1H-Indol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazole derivatives / E. Y. Mendogralo, L. Y. Nesterova, E. R. Nasibullina [et al.] // Molecules. 2023. Vol. 28, N 20. Art. 7095.

АДАПТАЦИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ МЕРЗЛОТНЫХ ПОЧВ (ЕРАВНИНСКАЯ КОТЛОВИНА, БУРЯТИЯ) К ИЗМЕНЕНИЮ УСЛОВИЙ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ

Л. П. Козырева, С. В. Зайцева, О. П. Дагурова, В. Б. Дамбаев

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Улан-Удэ, l-kozyr@mail.ru

Мерзлотные почвы представляют особый интерес, как экстремальные местообитания микроорганизмов, подверженных сезонным и суточным колебаниям в верхних активных слоях, так и наоборот, сохраняющие относительно стабильные условия обитания в многолетней мерзлоте. Микробные сообщества реагируют на изменения условий обитания, адаптируясь на уровне сообществ и отдельных клеток [Microbial adaptation ... , 2022; Microbial adaptations at ... , 2023].

Нами была изучена структура прокариотного сообщества почв на южной границе вечной мерзлоты на полигон-трансекте (ПТ) Дархитуй-Хаймисан и влияние на неё физико-химических параметров почвы в разные периоды оттаивания. ПТ находится на юго-западе Витимского плоскогорья (Еравнинский район Бурятии), его протяженность около 8 км. ПТ «Дархитуй» состоит из длинного пологого склона северо-восточной экспозиции, от одноименной таежной горы Дархитуй (1015 м) до приозерных равнин с луговыми степями (948 м). Конечной точкой ПТ явилось высохшее термокарстовое оз. Хаймисан. Почвы ПТ подробно охарактеризованы ранее [Soils of the Darkhitui ... , 2021]. Структуру прокариотного сообщества ПТ Дархитуй-Хаймисан оценивали на основе профилирования по гену 16S рРНК.

Отбор проб проводили в начальный период оттаивания почвы (17.05.2021) и в период её максимального оттаивания (19–22.09.2022) ручным буром.

Физико-химическая характеристика весенних проб дана ранее [Microbial community ... , 2022]. Осенью мерзлота выявлена на глубине 250–260 см. В верхних почвенных горизонтах температура составляла 4–9 °С, на глубине 1 м – 4,3–4,8 °С. Влажность варьировалась в верхних горизонтах от 20 % (в березовом лесу и оз. Хаймисан) до 36 % (степь); рН водной вытяжки по профилю значительно не изменялся и находился для ПТ «Дархитуй» в слабо-кислой – нейтральной областях, оз. Хаймисан – слабо-щелочной. Содержание органического вещества было максимальным в верхних горизонтах (весной 1,6–11,4 %, осенью 7,8–10,5 %), а также в погребенном горизонте А, выявленном на глубине 240 см в оз. Хаймисан (5,27–5,15 %). В почвенных образцах также было определено содержание нитратного и аммонийного азота. Более высокие значения определены в весенних пробах.

Проанализированы изменения в составе микробных сообществ в сравнении с полученными ранее результатами в начальный период оттаивания [Microbial community ... , 2022]. Комплексный анализ микробного распределения выявил высокий уровень микробного разнообразия во всех почвенных горизонтах активного слоя в период начального и максимального оттаивания, а также в многолетней мерзлоте. Основными факторами, которые определяли состав микробного сообщества почвы весной, были рН, температура, влажность. В период максимального оттаивания – температура, содержание органического вещества, нитратного и аммонийного азота. *Actinobacteriota*, *Alpha-* и *Gamma*proteobacteria доминировали во всех образцах; *Firmicutes*, *Crenarchaeota* и *Bacteroidota* – в отдельных пробах в разные периоды оттаивания почвы (табл.).

Таблица

Распределение основных филумов в мерзлотных почвах Еравнинской котловины (%)

Таксоны	Березовый лес, Дархитуй				Оз. Хаймисан			
	активный слой		мерзлота		активный слой		мерзлота	
	весна	осень	сезонная	многолет.	весна	осень	сезонная	многолет.
<i>Crenarchaeota</i>	6,38	3,07	22,42	0,21	1,06	0,8	0,94	0,22
<i>Acidobacteriota</i>	3,63	4,02	5,38	0,48	5,48	7,35	2,41	1,05
<i>Actinobacteriota</i>	16,49	26,86	16,6	51,06	24,16	25,25	55,64	27,7
<i>Firmicutes</i>	23,34	3,84	10,15	3,74	11,79	1,4	1,87	2,77
<i>Alphaproteobacteria</i>	23,02	26,06	17,3	24,52	18,44	23,32	16,95	10,26
<i>Gamma</i> proteobacteria	6,77	10,85	6,4	12,5	13,94	16,71	11,3	41,35
<i>Bacteroidota</i>	4,6	7,54	4,56	3,59	6,68	16,46	3,15	13,49
<i>Verrucomicrobiota</i>	4,96	6,9	6,05	1,33	1,17	1,1	1,29	0,44
<i>Gemmatimonadota</i>	1,03	1,56	1,16	0,5	0	0	0	0
<i>Planctomycetota</i>	3,98	2,16	1,27	0,41	0	0	0	0,29
<i>Desulfobacterota</i>	0,1	3,3	3,46	0,26	0	0	0,19	0
<i>Myxococcota</i>	0,69	1,08	0	0	0	0	0,35	0,35
<i>Halobacterota</i>	0	0	0	0	3,66	0,32	1,09	0,36
<i>Euryarchaeota</i>	0	0	0	0	1,61	1,17	0	0,14
<i>Chloroflexi</i>	0	0	0	0	1,49	1,9	0,27	0,2
Unclassified Bacteria	4,65	2,49	4,31	0,78	4,16	2,05	2,75	1,19
Другие	0,36	0,27	0,94	0,62	1,24	2,17	0,52	0

Actinobacteriota были идентифицированы как одни из таксонов-индикаторов мерзлых горизонтов. Ранее почвенные *Actinobacteriota* традиционно считались мезофильными организмами, которые с трудом адаптируются к низким температурам. Однако в последнее десятилетие появляется все больше работ, посвященных выделению психротолерантных актинобактерий из холодных мест обитания [Прокопенко, Зенова., Манучарова, 2019] и присутствия *Actinobacteriota* в мерзлоте [Abrupt permafrost ... , 2023; Microbial and Geochemical ... , 2021]. Отличительной особенностью почвы Хаймисана было увеличение доли *Gamma*proteobacteria по направлению к многолетней мерзлоте за счет представителей психрофильных

родов копиотрофного семейства Comamonadaceae. Bacteroidetes доминировали в составе микробного сообщества слоя вечной мерзлоты в степи. Олиготрофные *Acidobacteriota* субдоминировали в активных почвенных горизонтах весной, что вероятно обусловлено их стрессоустойчивостью к колебаниям температуры.

Таким образом, структура микробных сообществ мерзлотных почв Еравнинской котловины изменяется в зависимости от конкретных условий их обитания. Выявлены значительные различия между верхним (активным) слоем почвы, сезонной мерзлотой, многолетней мерзлотой, а также между типами экосистем (лиственничный лес, березовый лес, степь, озеро).

Исследования выполнены в рамках темы госзадания «Микробные сообщества экстремальных природных экосистем Байкальского региона: структурно-функциональная организация и биотехнологический потенциал (№ госрегистрации 121030100229-1).

Литература

Прокопенко В. В., Зенова Г. М., Манучарова Н. А. Экофизиологическая характеристика психротолерантных актиномицетов тундровых и лесных ландшафтов // Почвоведение. 2019. № 6. С. 734–742.

Abrupt permafrost thaw triggers activity of copiotrophs and microbiome predators / M. Scheel, A. Zervas, R. Rijkers [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. 2023. Vol. 99, N 11. Art. fiad123.

Microbial adaptation to different environmental conditions: molecular perspective of evolved genetic and cellular systems / A. K. Wani, N. Akhtar, F. Sher [et al.] // Arch. Microbiol. 2022. Vol. 204, N 2. Art. 144.

Microbial adaptations at higher altitude for sustainable development: A review / M. Singh, K. Jayant, D. Singh [et al.] // J. Appl. Pharm. Sci. 2023. Vol. 13, N 6. Art. 001–009.

Microbial and Geochemical Evidence of Permafrost Formation at Mamontova Gora and Syrdakh, Central Yakutia / M. Y. Cherbunina, E. S. Karaevskaya, Y. K. Vasil'chuk [et al.] // Front. Earth Sci. 2021. Vol. 9. Art. 739365.

Microbial community in the permafrost thaw gradient in the south of the Vitim plateau (Buryatia, Russia) / S. Zaitseva, N. Badmaev, L. Kozyreva [et al.] // Microorganisms. 2022. Vol. 10, N 11. Art. 2202.

Soils of the Darkhitui catena in the southern Vitim Plateau and their micromorphological features / A. Gyninova, N. Badmaev, Yu Tsybenov [et al.] // IOP Conf. Series: Earth Environ. Sci. 2021. Vol. 862, N 1. Art. 012068.

АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ К ЗАМЕРЗАНИЮ/ОТТАИВАНИЮ В ЗОНЕ ВЛИЯНИЯ ЗИМНЕГО ОПОЛЗНЯ

Л. М. Кондратьева¹, Д. В. Андреева¹, З. Н. Литвиненко¹,
Е. М. Голубева²

¹Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,

Хабаровск, kondratevalm@gmail.com

²Институт тектоники и геофизики им. Ю. А. Косыгина ДВО РАН,

Хабаровск, evg8302@yandex.ru

Преобладание микробной жизни в многолетней мерзлоте с возрастом до нескольких миллионов лет хорошо задокументировано. Однако долгосрочная выживаемость, эволюция и метаболическая активность микроорганизмов в замороженном состоянии остаются недостаточно изученными [Predominance of Anaerobic ... , 2019]. Способность психротрофных бактерий выживать при низкой температуре обусловлена адаптационной стратегией, которая вырабатывается на клеточном и молекулярном уровнях [Role of psychrotrophic ... , 2022]. Все эти изменения на клеточном уровне зависят от многих факторов окружающей среды. Скорость адаптации может зависеть от условий циклического заморозания и оттаивания (ЦЗО). Биогеохимические процессы, происходящие при сезонном заморозании воды и пород, могут сопровождаться опасными явлениями, включая оползни.

В декабре 2018 г. при температуре $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ с левого берега Бурейского водохранилища сошел один из крупнейших в мире оползень, который представляет собой уникальное природное явление в водоеме, покрытом льдом [Крупный оползень ... , 2019]. О причинах его схода до сих пор идет дискуссия. Первые результаты микробиологических исследований в зоне влияния оползня были проведены в период ледостава и весенний период 2019 г. [Изменение численности ... , 2021]. Дальнейшие работы по оценке адаптационного потенциала микроорганизмов к заморозанию/оттаиванию в зависимости от потребляемых источников углерода проводили *in vitro*.

В работе представлены результаты исследования биотрансформации гумата натрия (ГNa) при участии микроорганизмов с разной историей адаптации к замораживанию/оттаиванию (табл.): биопленки на зернах горных пород и суспензия клеток из культуральной жидкости после ЦЗО. Используются штаммы бактерий, выделенные из воды вокруг тела Бурейского оползня, которые обладали характерными физиологическими свойствами, определяющими их адаптацию к низким температурам: *Arthrobacter sp.* 13НП – поверхностная вода ниже тела оползня; *Pseudomonas sp.* 17ВП – поверхностная вода выше тела оползня; *Actinomyces sp.* 45ВД – придонная вода выше тела оползня. Замораживание образцов проводили при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, оттаивание при разном

диапазоне температур (+4 °C и +23 °C). Характер биотрансформации ГNa после ЦЗО исследовали спектральными методами при разных длинах волн на спектрофотометре Shimadzu UV-3600. При 254 нм определяли алифатические фрагменты макромолекулы; при 275 нм – ароматические компоненты; при 465 нм – хромофорные группы [Application of spectrophotometry ... , 2015].

Таблица

Влияние микроорганизмов на спектральные характеристики гумата натрия при разных условиях заморзания/оттаивания

Инокулят	Условия ЦЗО	254нм	275нм	465 нм
Биопленка на породе шт 17 ВП (БП 1)	1 этап: замораживание при –18 °C (30 сут.), 5 циклов З/О, температура оттаивания при 4 °C; 2 этап: высушивание, новая среда с ГNa; замораживание на 30 сут.	2,918	2,551	0,458
Биопленка на породе шт 17 ВП (БП 9)	1 этап: замораживание при –18 °C (30 сут.), 5 циклов З/О, температура оттаивания при 23 °C; 2 этап: высушивание, новая среда с ГNa, замораживание на 30 сут.	1,951	1,683	0,263
Суспензия шт 17 ВП (1Н)	Суспензия после З/О, оттаивание при 4 °C; акклиматизация 10 сут. при 23 °C на ГNa, новое замораживание на 30 сут.	3,627	3,202	0,612
Суспензия шт 17 ВП (9Н)	Суспензия после З/О, оттаивание при 23 °C, акклиматизации 10 сут. при 23 °C на ГNa, новое замораживание на 30 сут.	3,252	2,861	0,452
ГВ 1	Суспензия 3-суточной культуры шт. 17 ВП рост на ГNa 10 сут., заморозка на 30 сут., оттаивание при 23 °C	4,585	4,302	0,690
ГВ 2	Суспензия 3-суточной культуры шт. 13 НП рост на ГNa 10 сут., заморозка 30 сут., оттаивание при 23 °C	4,572	4,312	0,697
ГВ 3	Суспензия 3-суточной культуры шт. 45 ВД рост на ГNa 10 сут., заморозка 30 сут., оттаивание при 23 °C	4,715	4,298	0,679
ГВ 4	Внесены суспензии трех штаммов, рост на ГNa 10 сут., заморозка 30 сут., оттаивание при 23 °C	4,470	3,989	0,618
ГNa контроль	Раствор ГNa после 1 этапа ЦЗО + 30 сут. при 4 °C	4,601	4,338	0,724

Исследования показали, что максимальные изменения спектральных характеристик ГNa по сравнению с контролем (без биогенного фактора) происходили при участии биопленок (БП 1, БП 9), которые прошли длительную адаптацию к ЦЗО. Трансформация касалась всех составляющих молекулы ГNa и мало зависела от температуры оттаивания. Существенному преобразованию подвергалась ароматическая составляющая и хромофорные группы молекулы ГNa при участии суспензии клеток (9Н), присутствующих в планктонном состоянии после ЦЗО и быстром оттаивании.

вании при 23 °С. После разовой заморозки активность отдельных штаммов (ГВ 1-3) и их суммарного консорциума (ГВ 4) была довольно низкой в присутствии стойких источников углерода.

Согласно проведенным исследованиям, сезонные и многолетние ЦЗО повышают природный потенциал микроорганизмов к низким температурам, за счет формирования биопленок на поверхности и в поровом пространстве горных пород. В регионах с оттаивающей мерзлотой источником углерода для микробного метаболизма могут выступать стойкие гуминовые вещества.

Литература

Изменение численности и активности микробсообществ в зоне влияния крупного оползня на Бурейском водохранилище / Л. М. Кондратьева, З. Н. Литвиненко, Д. В. Андреева, А. С. Башкурова // Биология внутренних вод. 2021. № 3. С. 243–252.

Крупный оползень в долине реки Бурей и цунами в водохранилище Бурейской ГЭС / А. Н. Махинов, В. И. Ким, А. В. Остроухов, Д. В. Матвеев // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2019. № 2. С. 35–44.

Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments / L. T. Shirshova, D. A. Gilichinsky, N. V. Ostroumova, A. M. Yermolayev // Earth's cryosphere. 2015. Vol. 19, N 4. P. 94–106.

Predominance of Anaerobic, Spore-Forming Bacteria in Metabolically Active Microbial Communities from Ancient Siberian Permafrost / R. Liang, M. Lau, T. Vishnivetskaya [et al.] // Appl. Environ Microbiol. 2019. Vol. 85, N 15. Art. e 00560–19.

Role of psychrotrophic bacteria and cold-active enzymes in composting methods adopted in cold regions / V. Manjapu, A. Lepcha, S. K. Sharma, R. Kumar // Advances in Appl. Microbiol. 2022. Vol. 121. P. 1–26.

МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА СОЛЕННЫХ ОЗЕР БАРГУЗИНСКОЙ КОТЛОВИНЫ: ЭКОЛОГИЯ, ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, ПЕПТИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ

Е. В. Лаврентьева

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ
Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, lena_l@mail.ru

Уникальной особенностью Баргузинской котловины является широкое распространение экстремальных местообитаний, которые являются местами выживания, сохранения и активной геохимической деятельности микробных сообществ, а также резервуарами выделения экстремофилов, имеющих биотехнологический потенциал.

Цель – определить таксономическое разнообразие микробных сообществ соленых озер Баргузинской котловины с помощью метода высокопроизводительного секвенирования по гену 16S рРНК, оценить влияние природных факторов на развитие микробного сообщества и установить адаптационный потенциал выделенных культур.

В данной работе представлены результаты исследования микробных сообществ сульфатного оз. Гуджирганское и содового оз. Нухэ-Нур (северный), расположенные на территории Баргузинской котловины. Водно-солевое питание исследуемые озера Баргузинской котловины получают за счет атмосферных осадков, выветривания и последующего выщелачивания окружающих их горных пород, а также за счет разгрузки подземных вод. Концентрирование растворенного вещества в озерах связано с удалением растворителя, что происходит в условиях Забайкалья в результате процессов испарения и вымораживания. Испарительное концентрирование связано с тем, что здесь летом господствуют аридные условия [Генезис воды и растворенных ... , 2020; Сульфатные минеральные ... , 2020]. Особенно эти процессы показательны для мелководного оз. Гуджирганское, которое в засушливый период года практически полностью пересыхает. Результаты физико-химических и гидрохимических исследований в озерах показали, что изученные озера относятся к сульфатному типу (оз. Гуджирганское) и содовому типу (оз. Нухэ-Нур) с высокими значениями рН. Так, в анионном составе доминирующим ионом являлся сульфат-ион в оз. Гуджирганское и гидрокарбонат-ион в оз. Нухэ-Нур. В воде озер определены хлориды, фториды и ионы кремния. Исследование катионного состава озер показало, что их характерной особенностью является преобладание в них ионов натрия, что свойственно высокоминерализованным водам. В условиях сухого климата натрий – характерный элемент испарительной концентрации и определяет многие геохимические особенности степных районов.

В образцах донных осадков озер Гуджирганское и Нухэ-Нур определен микроэлементный состав. Установлено, что в донных осадках оз. Гуджирганское отмечается пре-вышение содержания относительно кларка для земной коры (по А. П. Виноградову) следующих элементов: Са, Mg, К, Na, S и Li. В оз. Нухэ-Нур содержание микроэлементов находилось на уровне кларковых значений, за исключением Al.

Нами проведена оценка структуры экстремофильных микробных сообществ соленых озер Гуджирганское и Нухэ-Нур. Выявлена закономерность таксономического разнообразия и структуры микробного сообщества в зависимости от биотопов в соленом оз. Гуджирганское и содовом оз. Нухэ-Нур (Баргузинская впадина). В рассоле соленого оз. Гуджирганское доминировали филумы *Pseudomonadota* (представители классов *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*) и *Bacteroidota*. В микробном мате доминировали *Gammaproteobacteria* (главным образом разнообразные представители рода *Aliidiomarina* (68 %) и *Cyanobacteriota*. В донных осадках преобладали *Bacillota* (30–32 %) и субдоминировали *Actinomycetota* и *Deinococcota*. Следует отметить, что во всех биотопах обнаружена большая доля некультивируемых прокариот и неисследованных групп микроорганизмов. Этот важный неизученный микробный компонент в соленом оз. Гуджирганское представлен как на уровне домена

Bacteria (до 17 %), так и на других крупных таксономических уровнях: unc_ *Bacillota* (до 29 % рассол), unc_ *Chitinophagaceae* (до 25 % микробный мат), unc_ *Bacteroidetes* (до 10 % донные осадки).

В изученных образцах донных осадков содового оз. Нухэ-Нур (северное) доминировали бактерии, представители архей составляли незначительную долю 0,6–2 %. Наибольшую долю в сообществе донных осадков оз. Нухэ-Нур составили представители филума *Pseudomonadota* классы *Gamma*proteobacteria (10–27 %), *Alphaproteobacteria* (5–11 %), *Bacteroidota* (14–43 %), *Actinomycetota* (3–15 %), *Chloroflexota* (5–12 %) и *Bacillota* (9–14 %), но их соотношение незначительно варьировало в разный период исследования. Особенностью таксономического состава микробного сообщества донных осадков Нухэ-Нур являлось доминирование ОТЕ, отнесенных к некультивируемым клонам, принадлежащим к таксонам разного ранга.

Анализ ССА показал влияние абиотической среды на распределение доминирующих филумов и классов филума *Pseudomonadota*. Филум *Bacillota* положительно коррелирует с ионами SO_4^{2-} и Na^+ , Содержание ионов $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$, NO_3^- влияли на распространение *Alphaproteobacteria*, *Deinococcota* и *Actinomycetota*. Температура и pH оказывает наибольшее влияние на преобладание филумов *Bacteroidota* и *Cyanobacteriota*. В результате анализа таксономического состава показано, что в оз. Гуджирганское микробное сообщество представлено в основном умеренно галофильными и галофильными бактериями, а в оз. Нухэ-Нур микробное сообщество представлено умеренно алкалофильными бактериями.

Из образцов воды оз. Нухэ-Нур выделены аэробные гетеротрофные полиэкстремофильные бактерии, которые отнесены к классам *Gamma*proteobacteria, *Alphaproteobacteria* и *Bacilli* с оптимумом развития при pH от 8–9,5 и солёности до 10 г/дм³. У выделенных культур бактерий была исследована способность секретировать внеклеточные пептидазы, активные на различных синтетических субстратах: BAPA, GlpAALpNa, LpNA, FpNA и GlpFpNA. Проведен сравнительный анализ секреции внеклеточных пептидаз в зависимости от источника белка 2 % в культивируемой среде (пептон, триптон, яичный альбумин), при различных значениях pH 7, 8,5 и 10, минерализации 0, 10 и 24 г/л, при различных температурах культивирования 5, 30 °C и времени культивирования (3, 5 и 7 сут.). Было показано, что внеклеточная пептидазная активность у изученных штаммов обладает широкой субстратной специфичностью. Данные анализа субстратной специфичности наиболее активных внеклеточных пептидаз указывают на их принадлежность к классу сериновых протеаз субтилизин-подобного и трипсин-подобного типа, а также аминокпептидаз. Определение температурного оптимума и стабильности фермента у выделенных штаммов бактерий показали оптимум при 30 и 40 °C, пептидазы сохранили более 50 % активности при температуре до 50 °C. pH оптимум

у штаммов обнаружен при рН 8 – 10, пептидазы стабильны при рН 7–11. Полученные данные свидетельствуют о широком спектре пептидаз, секретируемых исследуемыми бактериями, что, возможно, в естественных местообитаниях позволяет им успешно использовать природные белковые субстраты. Пептидазы продемонстрировали полиэкстремофильные свойства, такие как высокую стабильность при щелочных рН и солёности среды, что указывает на возможность исследуемых бактерий проявлять большую гибкость в функционировании при изменении параметров среды в озере.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20050, <https://rscf.ru/project/24-24-20050/>»)

Литература

Генезис воды и растворенных веществ содовых озер Нижнего куйтуна Баргузинской впадины / А. М. Плюснин, Е. Г. Перязева, М. К. Чернявский [и др.] // География и природные ресурсы. 2020. № 3. С. 89–97.

Сульфатные минеральные озера Западного Забайкалья: условия образования, химический состав воды и донных отложений / А. М. Плюснин, З. И. Хажеева, С. С. Санжанова [и др.] // Геология и геофизика. 2020. Т. 61, № 8. С. 1055–1073.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ СОСТАВОМ И МИКРОБИОМ ОБРАЗЦОВ ПОЧВ, ОТОБРАННЫХ НА ЗАПАДНОМ ПОБЕРЕЖЬЕ ОЗ. БАЙКАЛ И ОСТРОВЕ ОЛЬХОН

Ю. А. Маркова¹, И. А. Васильев¹, Д. А. Кривенко¹, И. С. Петрушин¹, П. А. Перерва, О. А. Чернышова¹, Е. Р. Хадеева^{2,3}, Р. Ю. Рыбьяков³, А. Х. Галивонджян⁴, А. О. Демкина⁴, К. А. Гилеп⁴, Д. А. Сутормин⁴

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Институт географии им. В. Б. Сочавы СО РАН, Иркутск

³Иркутский государственный университет, Иркутск

⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва

juliam06@mail.ru

Изучение аридных экосистем имеет первостепенное значение, так как занимая 45 % мировой поверхности, они наиболее сильно подвержены деградации в следствие изменения климата или хозяйственной деятельности человека [Dryland microbiomes ... , 2024; Microbial communities ... , 2020].

Одним из важных компонентов почвы является ее микробиом, который играет решающую роль в круговороте веществ, формировании и функционировании почвы, ее плодородии, а также продуктивности растений.

Исследования проводились на западном побережье оз. Байкал и острове Ольхон, которые характеризуются резко-континентальным сухим климатом. Недостаток атмосферного увлажнения усугубляется высокой водопроницаемостью щебнисто-суглинистых почв и грунтов [Белозерцева, Лопатина, Зверева, 2019]. Цель работы состояла в определении взаи-

мосвязи между физико-химической характеристикой почвенных образцов, отобранных на территории Ольхонского района и составом их микробиома.

На каждой из шести исследуемых площадок сделано описание ландшафта и почвенных профилей. Отбор и анализ физико-химических свойств почвы (рН, содержание гумуса, полевая влажность, соотношение фракций песка и глины) проводился общепринятыми методами. Выделение ДНК проводили с помощью набора DNeasy PowerSoil Pro Kits (Qiagen, Германия). Для статистического анализа полученных ампликонов использовали программы R и <https://www.microbiomeanalyst.ca>.

Было обнаружено 27 типов бактерий и архей, включая группу неклассифицированных последовательностей. Из них доминировали филумы Actinobacteriota (до 49,7 %), Proteobacteria (до 28,2 %) и Acidobacteriota (до 14,7 %). Видовое разнообразие, рассчитанное с помощью индексов Chao1 были значимо ниже у проб отобранных на о. Ольхон (392,3 и 672,4) по сравнению с пробами с западного бережья оз. Байкал (828,0; 918,3; 810,3; 883,1 – соответственно).

С помощью методов главных компонент и канонического корреляционного анализа установлена зависимость структуры почвенных микробиомов от характеристики исследуемых почвенных образцов. Показано, что различия между микробиомами первой и второй площадок, расположенных на о. Ольхон, и микробиомами третьей – шестой площадок, отобранными на западном побережье оз. Байкал, обусловлены значениями рН. Почвы о. Ольхон имели рН 5,41–6,31, а почвы западного побережья 7,8–8,73. Различия между микробиомами почв с первой и второй площадок связаны с содержанием гумуса (0,27 и 3,36 % соответственно). Таксономический состав микробиомов с третьей и пятой площадок имел положительную связь с полевой влажностью (0,74 %) и отрицательную с содержанием углерода. А состав микробиома с четвертой и шестой площадок имел отрицательную связь с рН почвы.

Полученные данные согласуются с имеющейся информацией о структуре микробиомов аридных почв умеренного климата [Microbial communities ... , 2020], за исключением крайне низкого содержания Bacteroidetes и Cyanobacteria. С помощью методов многомерной статистики выявлена зависимость таксономического состава почвенного микробиома от физико-химических свойств почвы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-26-00204.

Литература

Белозерцева И. А., Лопатина Д. Н., Зверева Н. А. Почвы восточного Приольхонья на побережье озера Байкал: современное состояние и использование // Бюллетень Почвенного института им. ВВ Докучаева. 2019. № 97. С. 21–51.

Dryland microbiomes reveal community adaptations to desertification and climate change / C. Coleine [et al.] // The ISME Journal. 2024. Vol. 18, N 1. DOI: 10.1093/ismejo/wrae056

Microbial communities from arid environments on a global scale. A systematic review / J. Vásquez-Dean [et al.] // Biological Research. 2020. Vol. 53. P. 1–12.

АДАПТАЦИОННЫЕ СТРАТЕГИИ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ СОЛЕННЫХ ОЗЕР (ВОСТОЧНОЕ ЗАБАЙКАЛЬЕ)

Е. Б. Матюгина¹, Н. Л. Белькова²

¹Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН
Чита, evgenia48@mail.ru

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
Институт эпидемиологии и микробиологии, Иркутск, nbelkova@gmail.com

Соленые озера широко распространены на планете. Они отличаются от других водных экосистем высокой вариабельностью экологических параметров не только в пространстве (морфометрические, физико-химические условия), но и во времени (межгодовые, межсезонные, суточные) [Matyugina, Belkova, 2015; Structure and diversity ... , 2018]. В связи с этим данные экстремальные экосистемы являются прекрасными моделями для изучения адаптационной стратегии микробных сообществ.

Проведено исследование микробных сообществ соленых озер Барун-Шивертуй, Шахалин-Нуур, Баин-Цаган, Укшинда, Дабаса-Нур, Горбунка, Хилганта, Шелута южного района Восточного Забайкалья.

Экологические условия в исследованных озерах имели высокую пространственную вариабельность. Морфометрические показатели соленых озер характеризовались объемом воды от 0,001 до $0,027 \cdot 10^3$ км, площадью водной поверхности от 0,80 до 3,36 км² и площадью водосбора от 10,0 до 98,0 км². Исследование среды обитания микробных сообществ показало широкий диапазон экологических параметров. Так, глубина озер в период исследования в июле 2022 г. варьировала и составляла от 0,3 до 4,5 м, прозрачность воды от 0,2 до 1,6 м, температура воды от 20,9 до 25,8 °С; рН от 8,8 до 9,58; Eh от 82,3 до 173,5; электропроводность от 7,647 до 89,096 мСм/см; содержание кислорода от 4,32 до 10,82 мг/дм³, мутность от 0,92 до 11,7. В зависимости от величины минерализации воды, озера были подразделены на две группы: солоноватые и соленые. Гидрохимический тип воды озер характеризовался как сульфатный натриевый, хлоридный-натриевый, карбонатно-гидрокарбонатный натриевый, карбонатно-гидрокарбонатный-сульфатный-натриевый.

Высокопроизводительным секвенированием гена 16S рРНК установлено структура и филогенетическое богатство микробных сообществ соленых озер Барун-Шивертуй, Шахали-Нуур, Баин-Цаган, Укшинда, Дабаса-Нур, Горбунка, Хилганта, Шелута. Метасеквенированием ампликонов в микробных сообществах озер идентифицировано 22 бактериальные и 1 архейная филы. Распределение доминирующих фил в микробных сообществах соленых озер было представлено так: Pseudomonadota (21 %), Bacteroidota (13,1 %), Acidobacteriota (12,9 %), Bacillota (1,4 %), Verrucomicrobiota (1,3 %), Cyanobacteriota (0,8 %).

Изучение таксономического разнообразия на уровне рода и/или семейств позволило охарактеризовать как доминирующие в минеральных озерах таксоны *Candidatus Aquiluna* филы *Actinomycetota*, неклассифицированные представители *Flavobacteriaceae*, *Comamonadaceae* и *Microbacteriaceae* фил *Bacteroidota*, *Pseudomonadota* и *Actinomycetota* соответственно.

Микробные сообщества минеральных озер характеризовались невысокой от 7,4 до 21 % долей доминирующих микроорганизмов в составе сообщества. Обращает на себя внимание высокая доля неидентифицированных микроорганизмов – в среднем до 46,9 %.

Ключевым метаболическим процессом для микробных сообществ озер Барун-Шивертуй, Баин-Цаган, Дабаса-Нур, Горбунка, Хилганта была гетеротрофия, а для микробных сообществ озер Шахалин-Нуур, Укшинда и Шелута – помимо гетеротрофии – аноксигенная фототрофия, нитрификация и восстановление нитратов и металлов.

В ходе исследования было изучено разнообразие внутри микробного сообщества (альфа-разнообразие) и разнообразие между микробными сообществами (бета-разнообразие) соленых озер. Анализ альфа-разнообразия показал, что наиболее высокое видовое богатство микроорганизмов детектировано для микробных сообществ минерального оз. Шахали-Нуур (437). Высокие значения индекса Шеннона, характеризующие разнообразие и выравненность сообщества были получены для минерального оз. Шелута (6,77), а низкие значения – для минерального оз. Горбунка (4,11). Интересно отметить, что индекс Симпсона был также максимальным для микробных сообществ минерального оз. Шелута (0,983). Оценка богатства таксонов – индекс *Chao1* и показатель филогенетического разнообразия Фейта были максимальными для микробных сообществ минерального оз. Шахали-Нур – 451,6 и 66,87 соответственно.

Методом главных компонент проанализирована взаимосвязь и адаптация микробных сообществ к экологическим условиям среды в соленых озерах. Установлено, что с первыми двумя факторами связаны 49,49 % общей вариации. С фактором 1, объясняющим 32,05 % вариации связаны рН, мутность воды и морфометрические параметры озера (площадь водной поверхности и водосбора озера, объем воды озера, глубина водного горизонта). В сформированном кластере первого фактора сгруппировались и микроорганизмы десяти фил *Actinomycetota*, *Acidobacteriota*, *Chloroflexota*, *Cyanobacteriota*, *Fusobacteriota*, *Fibrobacterota*, *Gemmatimonadota*, *Halobacterota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota*, а также неидентифицированные филоциты. Фактор 2, объясняющий 17,44 % вариации, преимущественно связан с температурой, Eh, минерализацией, содержанием кислорода в воде и микроорганизмами других десяти фил. Сформированный в области второго фактора один кластер включал микроорганизмы пяти фил *Bacillota*, *Campilobacterota*, *Desulfobacterota*, *Spirochaetota* и *Synergistota*, которые были тесно связаны с температурой

воды и Eh. Другой крупный кластер демонстрировал взаимосвязь абиотических параметров среды минерализации и содержания кислорода в воде с микроорганизмами пяти фил Bacteroidota, Bdellovibrionota, Halanaerobiaeota, Pseudomonadota и Thermotogota.

Таким образом, по результатам статистической обработки данных было выделено три крупных кластера, сформированных микроорганизмами разной таксономической принадлежности. Это свидетельствует о том, что в экосистеме соленых озер складываются условия благоприятные для адаптации микробного сообщества, которые приспосабливаются к множеству различных экологических условий и соответственно экологических ниш. В исследованных объектах не установлено условий благоприятных для адаптации к единой общей экологической нише. Следовательно, адаптация микробных сообществ соленых озер с большой долей вероятности является немонотонной функцией.

Работа выполнена по проекту № 121032200116-7 «Гидрология вод суши как фактор эволюции биогеохимических систем».

Литература

Matyugina E., Belkova N. Distribution and diversity of microbial communities in meromictic soda Lake Doroninskoe (Transbaikalia, Russia) during winter // Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 2015. Vol. 33. P. 1378–1390.

Structure and diversity dynamics of microbial communities at day and night: investigation of meromictic Lake Doroninskoe, Transbaikalia, Russia / E. Matyugina, S. Borzenko, P. Lukyanov [et al.] // Journal of Oceanology and Limnology. 2018. Vol. 36. P. 1978–1992.

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МОРСКИХ ГРИБОВ *PENICILLIUM HISPANICUM*, *ASTEROMYCES CRUCIATUS*, *ASPERGILLUS FUMIGATUS* КАК СПОСОБ АДАПТАЦИИ К ИЗМЕНЕНИЮ УСЛОВИЙ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Л. Е. Нестеренко, Е. А. Юрченко, А. Н. Юрченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН
Владивосток, nesterenko_le@piboc.dvo.ru

Факторы внешней среды при культивировании морских грибов оказывают значительное влияние на выход вторичных метаболитов. Изменение состава питательной среды и условий культивирования позволяет регулировать синтез этих веществ, что открывает широкие возможности для получения соединений с нужными свойствами.

Целью данного исследования было оценить, как изменение условий культивирования штаммов морских грибов *Penicillium hispanicum* КММ 4689, *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 и *Aspergillus fumigatus* КММ 4631 влияет на продукцию их вторичных метаболитов.

С помощью метода ВЭЖХ УФ/МС было показано, что культивирование морского гриба *Penicillium hispanicum* КММ 4689 в условиях осмотического (солевого) стресса при 22 °С и при 30 °С приводит к изменению продукции его метаболитов [A Study of the Metabolic ... , 2023]. При температуре 22 °С и содержании морской соли 5 мг/мл значительно снижалось содержание большинства обнаруженных соединений, а при температуре 30 °С и содержанием морской соли 50 мг/мл значительно увеличивалась продукция дезоксиизоаустамидных алкалоидов, характерных для этого штамма [New Deoxyisoaustamide ... , 2021]. Из экстракта этого гриба, культивированного при температуре 22 °С и 5 мг/мл морской соли, был выделен неизвестный ранее для этого гриба антрахинон эндокроцин.

Ранее [New Antibacterial ... , 2022; Anthraquinone Derivatives ... , 2023] из культуры гриба *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 были выделены две группы вторичных метаболитов: хлорсодержащие полигидроксилированные циклогексановые производные и ряд антрахинонов. При культивировании с добавлением в среду йодида калия хлорсодержащие вторичные метаболиты в экстракте культуры гриба не обнаруживались, а были выделены только антрахиноны: ω-гидроксипахибазин, кониотириинон В, акруцихинон С, плеоспороин и рубрумол – известные метаболиты *A. cruciatus*, а также пахибазин и 1,7-дигидрокси-3-метил-9,10-антрахинон, ранее не выделявшиеся из этого гриба.

При совместном культивировании штамма морского гриба *Aspergillus fumigatus* КММ 4631 с грибами *Penicillium hispanicum* КММ 4689, *Amphichorda* sp. КММ 4639, *Penicillium* sp. КММ 4672 и *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 метаболитные профили совместных культур *A. fumigatus* с *P. hispanicum*, *Penicillium* sp. и *Amphichorda* sp. были сходны с монокультурами *P. hispanicum*, *Penicillium* sp. и *Amphichorda* sp. [The Metabolite Profiling ... , 2023]. В то же время метаболитный профиль совместной культуры *A. fumigatus* с *A. cruciatus* отличался от каждой монокультуры.

В экстракте культуры *A. fumigatus* было идентифицировано 20 известных низкомолекулярных соединений. Совместное культивирование *A. fumigatus* с *A. cruciatus* приводило к появлению в экстракте индолмолочной кислоты, которая ранее была неизвестна для этих грибов, а также в хроматограммах было обнаружено большое количество пиков, которые не удалось отнести к известным соединениям.

Антрахиноны обладают различной биологической активностью, играя заметную роль в адаптации грибов к окислительному стрессу. Увеличение их продукции изученными штаммами грибов, очевидно, является их способом адаптации к измененным условиям культивирования. Биологическая роль дезоксиизоаустамидных алкалоидов пока неизвестна, но, вероятно, также связана с адаптацией гриба-продуцента к солевому и температурному стрессу. Дальнейшее изучение роли этих низкомолекулярных метаболитов в жизнедеятельности грибов позволит моделировать

условия культивирования для их максимальной продукции, что делает возможным детальное изучение их биологической активности в различных моделях *in vitro* и *in vivo* социально-значимых заболеваний человека.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1052).

Литература

A Study of the Metabolic Profiles of *Penicillium dimorphosporum* KMM 4689 Which Led to Its Re-Identification as *Penicillium hispanicum* / L. E. Nesterenko, R. S. Popov, O. I. Zhuravleva [et al.] // Fermentation. 2023. Vol. 9, N 4. Art. 337.

Anthraquinone Derivatives and Other Aromatic Compounds from Marine Fungus *Asteromyces cruciatus* KMM 4696 and Their Effects against *Staphylococcus aureus* / O. I. Zhuravleva, E. A. Chingizova, G. K. Oleinikova [et al.] // Marine drugs. 2023. Vol. 21, N 8. Art. 431.

New Antibacterial Chloro-Containing Polyketides from the Alga-Derived Fungus *Asteromyces cruciatus* KMM 4696 / O. I. Zhuravleva, G. K. Oleinikova, A. S. Antonov [et al.] // Journal of Fungi. 2022. Vol. 8, N 5. Art. 454.

New Deoxyisoaustamide Derivatives from the Coral-Derived Fungus *Penicillium dimorphosporum* KMM 4689 / O. I. Zhuravleva, A. S. Antonov, V. T. D. Trang [et al.] // Marine Drugs. 2021. Vol. 19, N 1. Art. 32.

The Metabolite Profiling of *Aspergillus fumigatus* KMM 4631 and Its Co-Cultures with Other Marine Fungi / A. N. Yurchenko, L. E. Nesterenko, R. S. Popov [et al.] // Metabolites. 2023. Vol. 13, N 11. Art. 1138.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ БАКТЕРИЙ РОДА *KOCURIA*

Е. М. Плешко, М. В. Журина

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»
Москва, lizapleshko@yandex.ru, mzhurik@gmail.com

Введение. Бактерии из рода *Kocuria* распространены повсеместно, среди них есть штаммы, вызывающие заболевания человека и домашних животных, и штаммы, имеющие биотехнологический потенциал. Устойчивость этих бактерий к антибиотикам имеет большое практическое значение, хотя на данный момент плохо изучена.

Методы. Для работы использовались три штамма бактерий из рода *Kocuria*: типовой штамм *K. rhizophila* 4R-31 и два штамма, выделенные с мясоперерабатывающего производства: *K. rhizophila* 155 и *K. carniphila* 988. Протестировано влияние на эти культуры 15 антибиотиков разных групп (табл.) помощью планшетного ридера-культуратора Биорад. Бактерии культивировали в 96-луночных планшетах в среде LB с разными концентрациями антибиотиков при перемешивании 120 об/мин и температуре 30 °С. Для получения кинетической кривой каждые пол часа измерялась оптическая плотность в лунках планшета при длине волны 540 нм.

Таблица

Концентрации антибиотиков, вызывающие подавление роста, мкг/мл

Антибиотик	<i>K. carniphila</i> 988	<i>K. rhizophila</i> 4R-31	<i>K. rhizophila</i> 155
Азитромицин	400	1	0,1
Канамицин	10	1	100
Фосфомицин	>1000	25	10
Хлорамфеникол	>500	>500	>500
Бацитрацин	100	10	10
Колистин	10	10	>100
Низин	100	100	100

Для поиска генов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, нами были получены полные геномы *K. rhizophila* 155 и *K. carniphila* 988. Полные геномы *K. rhizophila* 4R-31 и некоторых других штаммов *Kocuria* были взяты из базы данных RefSeq. Из всех геномов были вырезаны гены 16s рРНК для построения филогенетического дерева. Для выравнивания последовательностей использовалась программа MUSCLE [Edgar, 2004]. Для построения дерева использовалась программа FastME [Lefort V., Desper R., Gascuel, 2015] с количеством итераций бутстрэп 1000. В базе данных CARD были найдены гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам. Из базы данных Uniprot были скачаны последовательности их белковых продуктов. Поиск гомологов белков в геномах осуществлялся с помощью программы tblastn. Для этого был написан скрипт на языке Python.

Результаты. Концентрации антибиотиков, подавляющие рост трех исследуемых штаммов, приведены в таблице. Все три штамма показали высокую устойчивость к хлорамфениколу и повышенную устойчивость к низину. Штамм *K. carniphila* 988 намного более устойчив к фосфомицину, азитромицину и бацитрацину, чем другие два штамма. Штамм *K. rhizophila* 155 более устойчив к канамицину и колистину. Остальные антибиотики подавляют рост всех трех штаммов в концентрациях не более 5 мкг/мл.

Биоинформатический анализ геномов *K. carniphila* 988 и *K. rhizophila* 155 показал наличие плазмид. В них закодированы гены белков, отвечающих за репликацию плазмид, и гены гипотетических белков. Мы предполагаем, что функции этих генов могут быть связаны с устойчивостью этих штаммов к антибиотикам. Также в этих геномах мы обнаружили большое количество генов, связанных с устойчивостью к антибиотикам (рис.). При этом разные штаммы сильно различаются по наличию генов. Мы предполагаем, что в ходе эволюции *Kocuria* гены устойчивости к разным антибиотикам неоднократно исчезали у бактерий, которые не взаимодействовали с данным антибиотиком, или появлялись в результате горизонтального переноса генов. Такое разнообразие может быть связано с тем, что бактерии из рода *Kocuria* распространены повсеместно и занимают различные экологические ниши.

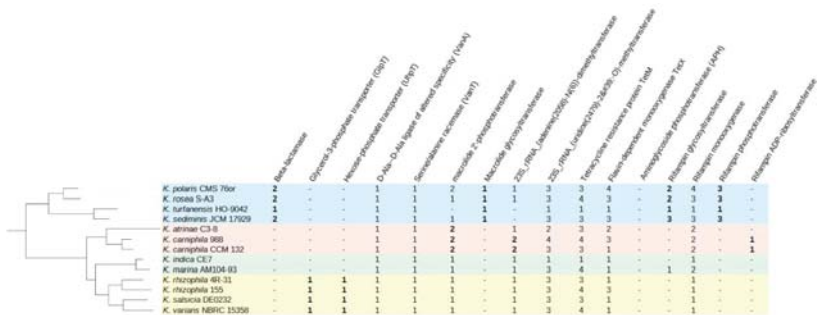


Рис. Распространение генов устойчивости к антибиотикам среди бактерий *Kocuria*

Также мы нашли в геномах исследуемых штаммов гены, которые могут обеспечивать показанную нами устойчивость этих штаммов к антибиотикам. Так, в геномах двух штаммов *K. rhizophila* есть только по одному гену макролид-2'-киназы (инактивирует макролиды) и 23S рНК (аденин(2058)-N(6))-диметилтрансферазы (препятствует связыванию макролидов с мишенью), в то время как у *K. carniphila* 988 есть две копии этих генов. Высокая устойчивость *K. carniphila* 988 к азитромицину может быть связана с наличием дополнительных копий этих генов. В геномах *K. rhizophila* ATCC и *K. rhizophila* 155 есть гены транспортеров UhpT и GlpT, через которые фосфомицин проникает в клетку. В геноме *K. carniphila* 988 этих генов нет, что может объяснить высокую устойчивость этого штамма к фосфомицину. Все три штамма неустойчивы к ампициллину, что объясняется отсутствием у них бета-лактамазы. При этом у других штаммов *Kocuria* бета-лактамаза есть. Кроме того, у всех исследуемых штаммов есть гены, которые могли бы обеспечивать устойчивость к тетрациклину, рифампицину и ванкомицину, но они неактивны, поскольку культуры чувствительны к этим антибиотикам. Конкретные гены, обеспечивающие у исследуемых штаммов устойчивость к хлорамфениколу, канамицину, бацитрацину, колистину и низину, пока не найдены. Устойчивость также может быть связана с активностью помп выброса и изменением метаболизма. Устойчивость к антимикробным пептидам может быть связана с действием протеаз. Для уточнения механизмов устойчивости мы планируем проводить дополнительные исследования, направленные на выяснения функций неизвестных генов, в частности, закодированных в плазмидях.

Выводы. Нами было показано, что бактерии из рода *Kocuria* обладают высокой устойчивостью к ряду антибиотиков и проведен биоинформатический анализ основ этой устойчивости.

Работа выполнена за счет средств гранта РФФИ № 24-24-20103.

Литература

- Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic acids research. 2004. Vol. 32, N 5. P. 1792–1797.
- Lefort V., Desper R., Gascuel O. FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program // Molecular biology and evolution. 2015. Vol. 32, N 10. P. 2798–2800.

БЕЛОК PSBS КАК КОМПОНЕНТ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЗАЩИТНОЙ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА У ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ЗЕЛЁНОЙ ВОДОРОСЛИ *LOBOSPHEERA INCISA*

**В. В. Птушенко^{1,2}, Г. Н. Бондаренко¹, Е. С. Глаголева¹,
Е. С. Лобакова¹, О. С. Птушенко¹, А. Е. Соловченко¹,
В. В. Терентьев⁵, Б. В. Трубицин¹, К. А. Шибзухова¹**

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, ptush@belozersky.msu.ru

²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва

³Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино

Фотосинтетический аппарат (ФСА) оксигенных фототрофных организмов способен образовывать, наряду с продуктами фотоассимиляции, также и активные формы кислорода (АФК). В условиях, вызывающих нарушение баланса между отдельными стадиями фотосинтеза, генерация АФК возрастает, что может привести к повреждению ФСА, снижению фотосинтетической функции организма и, в конечном итоге, угнетению его роста. Такие условия могут создаваться действием различных стрессовых факторов: высокой освещённости, низкой температуры, дефицита элементов минерального питания, и др. Наряду со специфическим эффектом, многие факторы имеют общий, универсальный эффект: снижение доли световой энергии, эффективно используемой растением, и, как следствие, возрастание доли света, ведущей, в конечном итоге, к генерации АФК. Фототрофные организмы выработали множество механизмов, позволяющих в стрессовых условиях снизить количество световой энергии, ответственной за генерацию АФК. Среди важнейших механизмов – так называемое нефотохимическое тушение (НФТ) возбуждённых состояний хлорофилла в ФСА.

НФТ включает в себя различные конкретные механизмы, действующие в разных временных масштабах. Самая быстрая компонента НФТ, обеспечивающая устойчивость ФСА к быстрому возрастанию интенсивности света (или же к быстрому падению эффективности его использования), называется энергозависимым тушением и индуцируется в секундной шкале времени, используя в качестве триггерного сигнала заклинение внутритилакоидного люмена. У водорослей и мохообразных ключевым участником этого процесса является белок LhcSR (Light harvesting com-

plex stress related protein). У сосудистых растений он отсутствует, и функцию генерации НФТ выполняет компонент фотосистемы 2 (ФС2), белок PsbS. PsbS также встречается у мохообразных и у харовых водорослей. Показано, что у мохообразных он осуществляет НФТ совместно с LhcSR [Role of PSBS ... , 2011].

Вопрос о присутствии и функциях PsbS у представителей эволюционно более древних групп водорослей, в частности, у зелёных водорослей (Chlorophyta), более сложный. Наличие генов, гомологичных PsbS, в геноме представителей Chlorophyta было известно достаточно давно, однако лишь в 2016 г. у них был обнаружен сам белок и показана стресс-индуцированная дифференциальная экспрессия его гена в клетках модельной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [Photosystem II subunit ... , 2016; *Chlamydomonas reinhardtii* PsbS ... , 2016]. Однако этот эффект был кратковременным (проявлялся в часовой шкале времени после стрессового воздействия), что было интерпретировано как участие PsbS в стрессовом ответе лишь в переходный период (в самом начале стресса); причём, в соответствии с этой точкой зрения, PsbS лишь способствует индукции LhcSR-зависимой защиты ФСА.

Используя в качестве модели психротолерантную одноклеточную зелёную водоросль *Lobosphaera incisa*, нам удалось показать, что этот белок может играть заметно более существенную роль у зелёных водорослей. Так, мы показали, что холодовой стресс вызывает значительное (до 10^3 – 10^4 раз) возрастание экспрессии PsbS, продолжающееся в течение нескольких (четырёх-пяти) суток, что сравнимо с динамикой изменений экспрессии белка LhcSR и значительно превосходит их по абсолютной величине (для LhcSR характерные изменения уровня экспрессии на два-три порядка меньше, т. е. находятся в районе 10). Содержание самого белка также значительно возрастает при стрессовом воздействии (до 10^2 раз) и достигает максимума на 10-е сут. после начала воздействия. Существенно, что изменения пигментного состава, в частности, содержания защитных каротиноидов виолаксантинового цикла, ответственных за НФТ, в период роста экспрессии PsbS, незначительны. При этом именно в этот первый период происходит наиболее значительное падение активности ФС2 и индукция задержанного (т. е. относительно долго релаксирующего) НФТ. Показано также, что этот ответ на стрессовое воздействие приводит к снижению скорости генерации АФК, что говорит о его эффективности в качестве защитного механизма. Всё это позволяет предположить, что PsbS является не вспомогательным, а основным участником защитной реакции ФСА в ответ на стрессовое воздействие.

Мы предполагаем, что данная функция PsbS характерна не только для *L. incisa*, но и для широкого спектра зелёных водорослей, включая такие одноклеточные водоросли, как представители родов *Deasonia*, *Desmodesmus* и *Bracteacoccus*.

Работа поддержана грантом РНФ № 24-24-00195.

Литература

Chlamydomonas reinhardtii PsbS protein is functional and accumulates rapidly and transiently under high light / T. Tibiletti, P. Auroy, G. Peltier, S. Caffarri // Plant physiology. 2016. Vol. 171. P. 2717–2730.

Photosystem II subunit PsbS is involved in the induction of LHCSR protein-dependent energy dissipation in *Chlamydomonas reinhardtii* / V. Correa-Galvis, P. Redekop, K. Guan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2016. Vol. 291. P. 17478–17487.

Role of PSBS and LHCSR in *Physcomitrella patens* acclimation to high light and low temperature / C. Gerotto, A. Alboresi, G. M. Giacometti [et al.] // Plant. Cell Environ. 2011. Vol. 34. P. 922–932.

ОСНАЩЕНИЕ ОЗДОРОВЛЕННЫХ КЛУБНЕЙ ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* КАК БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРОЛОНГИРОВАННОГО УПРАВЛЕНИЯ УРОЖАЙНОСТЬЮ, АДАПТИВНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ И КАЧЕСТВОМ КАРТОФЕЛЯ

Л. И. Пусенкова¹, С. Р. Гарипова^{1,2}, О. В. Ласточкина^{2,3}

¹Башкирский НИИСХ УФИЦ РАН, Уфа, l.pusenkova@mail.ru

²Уфимский университет науки и технологий, Уфа, garipovasvetlana@gmail.com

³Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, oksana.lastochkina@ufaras.ru

Картофель – важнейшая продовольственная, техническая и кормовая культура, ценность которой определяется содержанием в клубнях крахмала, белка, витаминов, аминокислот и минеральных солей. Генетический потенциал продуктивности возделываемых сортов картофеля реализуется лишь при условии использования высококачественных семенных клубней, качество и жизнеспособность которых определяются их фитосанитарным и физиологическим состоянием. Метод бактеризации растений полезной микрофлорой – один из наиболее перспективных экологических подходов в системе семеноводства и производства картофеля.

В данной работе изучено влияние инокуляции семенных оздоровленных гидропонных мини-клубней и клубней репродукции суперэлита эндофитными бактериями *Bacillus subtilis* 10-4 на содержание фотосинтетических пигментов, продуктивность, устойчивость растений и клубней к болезням в период вегетации и уборки, а также показатели качества клубней.

Объектами исследования служили оздоровленные гидропонные мини-клубни, клубни репродукции суперэлита, а также растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) районированного сорта Башкирский, эндофитные бактерии *Bacillus subtilis* 10-4 (из коллекции Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН). Семенные клубни инокулировались бактериями путем их погружения в суспензию *B. subtilis* 10-4 (10^8 КОЕ/мл) на 1 ч, подсушивались на воздухе и высаживались в почву в предварительно нарезанные гребни. Полевые эксперименты проводились в условиях Предуральской степной зоны Республики Башкортостан на черноземе выщелоченном. Ростовые

показатели, содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла (Хл) а, Хл b и каротиноидов (Кар)) определяли в основных фазах развития растений (всходы, бутонизации, цветения) с использованием классических методов. Колонизацию растительных тканей *B. subtilis* оценивали с использованием поверхностно-стерилизованных клубней и растений. Урожайность клубней, товарность, а также показатели качества оценивали сразу после уборки. Распространенность болезней оценивали на вегетирующих растениях и клубнях картофеля. Метагеномный анализ грибных патогенов в листьях и клубнях проводили по внутреннему транскрибируемому (ITS, internal transcribed spacer) или ITS-региону на приборе MiSeq (Illumina, США). Показатели качества клубней (включая содержание сухого вещества, крахмала, витаминов, макро- микроэлементов и т. д.) оценивали классическими и современными методами.

Выявлено, что при предпосадочном замачивании семенных оздоровленных мини-клубней и клубней суперэлита в суспензии *B. subtilis* 10–4, бактерии успешно колонизировали клубни и в дальнейшем растения (корни, наземную часть), тем самым способствовали ускорению прорастания и наступлению фенологических фаз растений, увеличению массы столонов, количества и массы клубней, с проявлением максимальных положительных эффектов при использовании способа инокуляции оздоровленных мини-клубней. Сравнительный анализ показал, что инокуляция оздоровленных мини-клубней и суперэлита *B. subtilis* 10–4 обеспечила закладку большего количества клубней на один куст по сравнению с необработанным контролем на 35 %, при этом продуктивность увеличилась на 68 и 17 % соответственно. В период вегетации выявлено повышение по сравнению с контролем содержания фотосинтетических пигментов (Хл а, Хл b и Кар) у инокулированных *B. subtilis* 10–4 растений из мини-клубней и суперэлита, главным образом, во второй половине вегетации: в фазе всходов сумма хлорофиллов (а + b) превышала контроль на 19 и 11 %, в фазе бутонизации – на 5 и 14 %, в начале цветения – на 50 и 43 % и окончания цветения – 27 и 53 % соответственно, что свидетельствует о положительном влиянии инокуляции на интенсивность и продолжительность работы ассимиляционного аппарата и отражается в повышении урожайности клубней. Предпосадочная инокуляция семенных клубней *B. subtilis* снижала распространенность болезней растений картофеля в период вегетации и уборки: альтернариозом в 1,5–1,8 раза в опыте с клубнями суперэлита и в 1,5 раза – с мини-клубнями, паршой серебристой – в 3,5 и 3 раза, сухой гнилью (фузариозом) – в 4,8 и 2,5 раза соответственно. При этом инокуляция мини-клубней эндофитами обеспечивала 3-кратное снижение видового разнообразия патогенного комплекса микромицетов на клубнях первого полевого поколения. Обращает на себя внимание факт отсутствия микромицетов рода *Fusarium* в микробиоме клубней, выращенных из инокулированных эндофитами мини-клубней. В то же время в необработанных вариантах как мини-клубней, так суперэлита обнаружи-

валось 3 вида *Fusarium spp.* Предпосадочная инокуляция клубней суперэлита эндوفитами не обеспечила защиту урожая клубней от фузариоза, что вероятно связано с исходным микробиомом семенных клубней, вследствие их заселения почвенными микробами в период выращивания. Выявлено, что при обоих способах инокуляции семенных клубней *B. subtilis* не было выявлено существенных различий в содержании в клубнях крахмала и сухого вещества, тогда как накопление питательных веществ (включая азот, фосфор, калий и витамин С) увеличилось и было максимально выраженным в варианте с применением оздоровленных мини-клубней. Выявлено, что инокуляция оздоровленных мини-клубней и суперэлита *B. subtilis* 10–4 способствовала повышению содержания аскорбиновой кислоты в клубнях до 73,80 и 69,33 мг % соответственно (в контроле 58,4 мг %), а также накоплению витамина В₁ до 4,92 г/кг (в контроле 0,75 г/кг). Кроме того, предпосадочная инокуляция клубней эндوفитами способствовала накоплению суммы антоцианов до 67,2 % (в контроле 1,98 %). В опыте с мини-клубнями предпосадочная обработка эндوفитами способствовала снижению интенсивности накопления редуцирующих сахаров в клубнях (до 0,13 %) по сравнению с контролем (0,46 %).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что способ обогащения выращенных на гидропонике оздоровленных семенных мини-клубней перед посадкой эндифитными *B. subtilis* имеет преимущество в сравнении с предпосадочной обработкой клубней суперэлита в качестве недорогого, экологически чистого подхода к производству семенного материала высокого качества. Качественные семенные клубни, не несущие существенной инфекционной нагрузки, имеют высокопродуктивный потенциал и за счет большей выносливости здоровых растений в меньшей степени будут подвержены воздействию болезней и других вредных организмов в следующем полевом поколении, что обеспечит надлежащий рост растений, повышение продуктивности и качество получаемых клубней, а также будет способствовать улучшению экологического состояния почв.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00262, <https://rscf.ru/project/23-26-0026>.

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕЛЕНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPIDONICUM*, ВЫЗЫВАЮЩЕЙ КОЛЬЦЕВУЮ ГНИЛЬ КАРТОФЕЛЯ

И. М. Романова, А. С. Мориц, И. А. Граскова

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, irina170885@mail.ru

Первичный контакт любой клетки с внешней средой осуществляется посредством биологических мембран. Адаптация к стрессам часто сопровождается реконструкцией клеточной мембраны. Первыми в ответные реакции на воздействие факторов окружающей среды отвечают жирные кислоты [Шипко, Дуванова, 2019].

Clavibacter michiganensis – аэробный грамположительный патогенный актиномицет рода *Clavibacter* с коринеформной морфологией, не образующий мицелий и споры, также известный как кольцевая гниль картофеля.

В работе использовали штамм *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) Ac-1405 (получен из ВКМ, г. Пущино, Московская обл.). Бактерии *Cms* выращивали на среде с глюкозой, пептоном и дрожжевым экстрактом (ГРУ). В качестве потенциальных агентов для оздоровления картофеля от *Cms* были исследованы наноконпозиты Se (НК Se/Ag), представляющие собой композицию токсичных наночастиц Se, плотно запакованных в матрицу арабиногалктана. НК Se/Ag не наносит вред растениям, под влиянием экзоферментов бактерий арабиногалктан распадается с высвобождением наночастиц Se [Граскова, 2022]. Использовали два вида НК Se/Ag, отличающиеся по содержанию селена (получены в ИрИХ СО РАН). Предшественники НК Se/Ag – арабиногалктан и BIS (2фенилэтил)диселенофосфинат натрия $(\text{PhCH}_2\text{CH}_2)_2\text{PSe}_2\text{Na}$ (BIS). Синтез НК 3,4 % Se (НК1) осуществляли согласно методике. Синтез НК 6,4 % Se (НК2) проводили окислением органилдиселенофосфината натрия пероксидом водорода. Для экспериментов использовали водные растворы наноконпозитов, содержание селена в которых составляло 0,000625 % [Пат. № 2557992 ... , 2015, Нанобиоконпозит селена ... , 2015].

Расположение наночастиц Se на клеточной стенке удалось подтвердить с помощью электронно-просвечивающего микроскопа и сканирующего зондового микроскопа. Наноконпозит воздействует на клеточную стенку бактериальных клеток, не проникая внутрь клетки. Гибель клетки происходит вследствие разрушения клеточной стенки.

В составе общих жирных кислот (ЖК) было выявлено 19 индивидуальных молекул, содержащих от 14 до 21 атома углерода. Насыщенные ЖК содержали линейные алифатические цепи, а также разветвлённые *изо*- и *антеизо* ЖК.

Таблица

Динамика жирных кислот бактерии *Cms* под действием нанокмозитов Se и их предшественников (представлены не все идентифицированные жирные кислоты)

Жирные кислоты	CMS	CMS +HK1	CMS +HK2	CMS +BIS
C15:0	0,10±0,013	6,03±8,81	0,11±0,01	0,18±0,03
C15:0-i	16,46±3,69	15,19±2,70	26,73±1,40	12,65±1,04
C15:0-a	14,28±2,58	15,95±3,08	19,04±2,87	10,53±0,27
C16:0	26,20±4,89	22,61±1,22	19,64±2,15	32,92±0,72
C17:0	0,19±0,023	0,19	0,13±0,02	0,00
C17:0-i	0,00	9,73±2,46	6,05±0,88	3,40±0,52
C17:0-a	4,40±0,86	6,65±0,37	7,17±0,39	4,27±0,14
C18:0	28,54±3,85	16,85±5,99	13,57±1,92	29,68±1,58

Наибольшее количество отмечено для нескольких кислот: изо-, анте-изо- пентадекановая кислоты, изо-, антеизо-маргариновая кислоты. Именно они являются маркерными для грамположительных бактерий. По данным кислотам можно проследить изменение ЖК состава после обработки НК (представлены не все идентифицированные жирные кислоты).

Из таблицы видно, что обработка НК1 и НК2 ведет к увеличению содержания изомеров пентадекановой кислоты (C15:0-i, C15:0-a), при этом значительное увеличение отмечено при обработке НК2. В примере с БИС напротив происходит уменьшение. Изомеры маргариновой кислоты (C17:0-i, C17:0-a) показывают аналогичные, как и изомеры пентадекановой кислоты.

При обработке НК1 и НК2 содержание насыщенных жирных кислот уменьшается. Особенно это заметно в варианте с НК2. С предшественником BIS содержание данных кислот увеличивалось.

В результате взаимодействия нанокмозита Se и *Cms* происходят морфологические изменения клеток. Наночастицы Se вызывают гибель клеток, не проникая внутрь клетки, воздействуя на саму клеточную стенку. При обработке нанокмозитами происходит снижение содержания ННЖК и повышение НЖК, что приводит к повышению микровязкости клеточной стенки и, как следствие, её полное разрушение.

Литература

Граскова И. А. Нанокмозиты как эффективный и безопасный способ борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : сб. тезисов докладов II Всерос. науч. конф. с Междунар. участием. Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г. Иркутск : Изд-во ИГУ. С. 214–216.

Нанобиокомпозит селена и арабиногалактана: синтез, строение и применение / Л. В. Родионова, И. А. Шурыгина, Б. Г. Сухов [и др.] // Журнал общей химии. 2015. Т. 85, № 2. С. 314–316.

Шипко Е. С., Дуванова О. В. Изменение спектра жирных кислот как один из механизмов адаптации/персистенции микроорганизмов // Микробиология. 2019. № 5. С. 109–118.

Пат. № 2557992 Рос. Федерация. Антиоксидантное средство с гепатопротекторным эффектом на основе наноструктурированного селена и способы его получения и применения / Е. А. Карпова, Б. Г. Сухов, Л. И. Колесникова [и др.]. 2015.

АДАПТАЦИЯ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

**В. М. Терёшина¹, Е. А. Януцевич¹, О. А. Данилова¹,
Г. А. Кочкина², С. А. Бондаренко^{1,3} Е. Н. Биланенко³,
М. Л. Георгиева^{3,4}, О. А. Грум-Гржимайло⁵**

¹Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, info@fbras.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушкино, adm@ibpm.ru

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, info@mail.bio.msu.ru, info@wsbs-msu.ru

⁴Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе, Москва, instna@sovintel.ru

⁵Университет Вагенингена, Вагенинген, Нидерланды

Среди экстремофилов выделяют различные группы по оптимальным условиям роста, включая температуру (психрофилы, термофилы), pH (ацидофилы и алкалофилы), давление (барофилы), ионную силу (галофилы), активность воды (ксерофилы). Экстремофильные микромицеты в процессе эволюции приобрели способность осуществлять свой жизненный цикл в экстремальных для большинства грибов условиях. Адаптация к любому стрессорному фактору является комплексом защитных процессов, включающих антиоксидантную защиту, синтез белков теплового шока, изменение состава мембран, повышение уровня осмолитов. Наше внимание будет сфокусировано на ключевом звене – защите мембран и макромолекул клеток у мицелиальных грибов-экстремофилов, которая осуществляется как за счёт изменения состава мембранных липидов, так и при помощи синтеза протекторных соединений углеводной природы – осмолитов.

По современным представлениям органические осмолиты, являются не только «совместимыми соединениями» (compatible solutes), как считалось ранее, но и метаболическими цитопротекторами [Yancey, 2005]. У грибов осмолиты представлены, в основном трегалозой и полиолами. Трегалоза, как и полиолы, может замещать воду в гидратных оболочках макромолекул, но, в отличие от полиолов, обладает способностью встраиваться в мембраны и стабилизировать их в условиях стрессорных воздействий.

Поддержание функционального состояния мембран при стрессе является ключевым звеном защитной системы и обеспечивается не только путем изменения их состава и структуры, но и стабилизирующим действием осмолита трегалозы [The significance of ... , 2005; Involvement of small ... , 2016; Yancey, 2005]. Так, обнаружено, что в условиях теплового шока у трегалозо дефицитных штаммов дрожжей происходят более масштабные перестройки состава мембранных липидов, чем у дикого штамма [Lipids and Trehalose ... , 2021]. Поэтому мы считаем важным исследование состава мембранных липидов и осмолитов во взаимосвязи.

Цель работы – изучить роль осмолитной и мембранной систем клеток в адаптации экстремофильных грибов к экстремальному фактору, а также под воздействием других стрессоров.

В качестве объектов исследования были выбраны алкалофилы *Sodiomyces tronii*, *S. alkalinus*, *S. magadii*; термофилы *Rhizomucor miehei*, *R. tauricus*, *Myceliophthora thermophila*; галоалкалотолерант *Emericellopsis alkalina*, галоксерофил *Aspergillus penicillioides*, ацидофилы *Mollisia* sp., *Phlebiopsis gigantea*, *Sistotrema brinkmanii*; психротолерант *Mucor flavus*, психрофил *Mucor psychrophilus*.

Липиды экстрагировали методом Николса и анализировали методом двумерной ТСХ и денситометрии (программное обеспечение Dens). Состав жирных кислот определяли методом ГЖХ. Углеводы экстрагировали кипящей водой, после удаления белков и заряженных соединений получали триметилсилильные производные, анализировали методом ГЖХ.

На примере термофильных, алкалофильных, ацидофильных и психрофильных грибов впервые установлено ключевое значение трегалозы в оптимальных условиях роста. У всех этих экстремофилов трегалоза доминирует в составе углеводов и полиолов (УиП) цитозоля, и ее количество увеличивается в процессе роста до 8 % от сухой массы. У ксерофилов, растущих в средах с пониженной активностью воды, основным осмолитом цитозоля становится глицерин.

В ответ на тепловой шок у термофилов снижается количество трегалозы в клетке, и не возникает приобретенной термоустойчивости, как у мезофилов. У алкалофилов, ацидофилов и психрофилов тепловой шок вызывает двукратное увеличение количества трегалозы, т. е. проявляется аддитивный эффект. У ксерофила, количество трегалозы также возрастает в ответ на тепловой шок, но не превышает 1 % от сухой массы, тогда как количество глицерина снижается. В ответ на осмотический шок у алкалофилов, ацидофилов и термофилов значительно повышается уровень полиолов, но при этом количество трегалозы не снижается, что указывает на важность этих осмолитов в адаптации. Холодовой шок не вызывает изменений в составе осмолитов у всех изученных экстремофилов, что, возможно, связано с высоким исходным уровнем трегалозы.

Изучение состава мембранных липидов у экстремофилов выявило общую закономерность – в качестве основного или доминирующего фосфолипида выявлены фосфатидные кислоты, которые относятся к небислойным липидам. В ответ на тепловой, осмотический и холодовой шоки в мембранных липидах экстремофилов значительные изменения происходят только в случае существенного снижения трегалозы в клетке. В случае поддержания или увеличения уровня трегалозы в клетке состав мембранных липидов остается стабильным.

Важным адаптационным фактором является текучесть мембран, на которую, по современным представлениям, воздействуют степень ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов, соотношение стерины/

фосфолипиды, синтез малых белков теплового шока. Наши исследования показали, что степень ненасыщенности мембранных липидов у экстремофилов разная. Обнаружено, что степень ненасыщенности возрастает у всех исследованных грибов только в ответ на холодовой шок. Колебания степени ненасыщенности в процессе роста, в ответ на тепловой и осмотический шоки незначительны.

Таким образом, впервые показана ключевая роль осмолитов в адаптации экстремофилов. Полученные результаты подтверждают гипотезу о взаимосвязи изменений в осмолитной и мембранной системах клетки при адаптации экстремофилов. Обнаруженные нами общие закономерности состава мембранных липидов, в составе которых преобладают небислойные фосфолипиды, указывают на особую структуру мембран экстремофильных микромицетов.

Литература

Involvement of small heat shock proteins, trehalose, and lipids in the thermal stress management in *Schizosaccharomyces pombe* / A. Glatz, A. Pilbat, G. L. Németh, K. Vince-Kontár // Cell Stress Chaperones. 2016. Vol. 21. P. 327–338.

Lipids and Trehalose Actively Cooperate in Heat Stress Management of *Schizosaccharomyces pombe* / M. Péter, P. Gudmann, Z. Kóta [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. Art. 13272.

The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing function / L. Vigh, P. V. Escribá, A. Sonnleitner [et al.] // Progress Lipid Research. 2005. Vol. 44. P. 303–344.

Yancey P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses // Journal of Experimental Biology. 2005. Vol. 208, N 15. P. 2819–2830.

ТРАНСФОРМАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ СЕЛЕНА НА ПРИМЕРЕ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*

А. В. Тугарова, А. А. Владимирова, А. А. Камнев

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
tugarova_anna@mail.ru, vladimirova-nastyusha@bk.ru, a.a.kamnev@mail.ru;

В природе бактерии играют ключевую роль в восстановлении оксоанионов селена и участвуют в его биогеохимическом цикле [Developments in the study ... , 2020; Tugarova, Kamnev, 2017; Selenium reduction by ... , 2022]. Оксоанионы селена – хорошо растворимые высокоподвижные в воде и почве соединения: селенат – SeO_4^{2-} (Se^{+6}) и селенит – SeO_3^{2-} (Se^{+4}) – являются самыми токсичными формами селена, загрязняющими окружающие почвы, водоемы и сточные воды производств. Восстановление оксоанионов у многих бактерий происходит до элементарного селена (Se^0) с формированием наночастиц (Se-НЧ).

В работе представлены результаты изучения трансформации оксоанионов селена различными видами бактерий рода *Azospirillum*. Основные

результаты были получены при использовании наиболее изученных типовых штаммов азоспирилл: *A. brasilense* Sp7 и *A. baldaniorum* Sp245, а также штамма *A. thiophilum* BV-S. Последний показал наибольшую устойчивость к токсическому действию селенит-ионов и был способен к остаточному росту при 15 мМ Na₂SeO₃, в отличие от первых двух штаммов, для которых была определена минимальная летальная концентрация 5 мМ, при которой рост отсутствовал.

Для *A. brasilense* Sp7 и *A. baldaniorum* Sp245 была показана способность к восстановлению селенита, но не селената [Reduction of selenite ... , 2014], в то время как штамм *A. thiophilum* BV-S, наряду со способностью восстанавливать селенит, был также способен к восстановлению селената в статичных условиях выращивания при ограничении доступа кислорода. Способность к восстановлению селенат-ионов в литературе описана для строгих анаэробов, которые используют селенат как конечный акцептор электронов при дыхании бактерий. Публикации о способности к восстановлению селената в неанаэробных условиях единичны; для азоспирилл это явление обнаружено нами впервые.

Был проведен транскриптомный анализ, с помощью которого определены гены, экспрессируемые в геноме штамма *A. thiophilum* BV-S при восстановлении селенат-ионов в статичных условиях при ограничении кислорода. Установлено, что происходит экспрессия более чем 60 генов, включая гены, связанные с различными процессами – метаболизмом селеносодержащих соединений, метаболизмом жирных кислот; гены, участвующие в других метаболических путях, а также в синтезе отдельных белков, в том числе пермеазы и различные транспортеры, и др. На сегодняшний день проводится анализ полученных данных для определения основных путей восстановления селената штаммом *A. thiophilum* BV-S.

Одним из основных методологических подходов при изучении восстановления оксоанионов селена была колебательная спектроскопия, включающая в себя взаимодополняющие методы: спектроскопию комбинационного рассеяния (СКР) и инфракрасную фурье-спектроскопию (ИКФС) [FTIR and Raman ... , 2018; Selenite reduction ... , 2020; FTIR spectroscopic ... , 2017]. ИКФС была использована при анализе: 1) биомассы при восстановлении оксоанионов селена; 2) биоорганической составляющей выделенных Se-НЧ [FTIR and Raman ... , 2018; FTIR spectroscopic ... , 2017]. СКР была использована при определении аллотропной модификации элементарного селена как в биомассе, так и в синтезированных Se-НЧ [FTIR and Raman ... , 2018; Selenite reduction ... , 2020].

ИКФС показала присутствие белков, полисахаридов и липидов в составе Se-НЧ. С помощью СКР, чувствительной к различным аллотропным модификациям селена, показано: 1) нахождение элементарного селена в наночастицах в аморфной модификации [FTIR and Raman ... , 2018, Selenite reduction ... , 2020]; 2) возможное участие соединений серы с формированием связей S–Se (соединение не идентифицировано) в клеточной

биомассе при восстановлении селенита в присутствии сульфата, что свидетельствует о взаимосвязи бактериальных метаболических путей трансформации соединений селена и серы у азоспирилл.

При изучении механизмов восстановления селенит-ионов установлено, что перенос селенит-ионов в бактериальную клетку у азоспирилл происходит без участия протон-зависимого транспорта, а вынос зародышей Se-НЧ из клетки проходит с его участием; само восстановление происходит при участии системы денитрификации, при этом редокс-система глутатиона, в отличие от многих других бактерий, не играет существенной роли в восстановлении селенит-ионов азоспириллами. Также были разработаны биотехнологические приемы бактериального синтеза Se-НЧ.

Детальное выяснение механизмов трансформации соединений селена представляет прикладной интерес, в первую очередь, для использования в биоремедиации загрязненных соединениями селена почв, водоемов и сточных вод производств, а также для других направлений в биотехнологии, таких как нанобиотехнология, производство пищевых добавок и продуктов, обогащенных селеном.

Работа поддержана грантом РНФ № 23-24-00582.

Литература

Developments in the study and applications of bacterial transformations of selenium species / J. J. Ojeda, M. L. Merroun, A. V. Tugarova [et al.] // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2020. Vol. 40, N 8. P. 1250–1264.

FTIR and Raman spectroscopic studies of selenium nanoparticles synthesised by the bacterium *Azospirillum thiophilum* / A. V. Tugarova, P. V. Mamchenkova, Yu. A. Dyatlova, A. A. Kamnev // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018. Vol. 192. P. 458–463.

FTIR spectroscopic studies of selenite reduction by cells of the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 and the formation of selenium nanoparticles / A. A. Kamnev, P. V. Mamchenkova, Yu. A. Dyatlova, A. V. Tugarova // *Journal of Molecular Structure*. 2017. Vol. 1140. P. 106–112.

Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles / A. V. Tugarova, E. P. Vetchinkina, E. A. Loshchinina [et al.] // *Microbial Ecology*. 2014. Vol. 68. P. 495–503.

Selenite reduction by *Proteus* sp. YS02: new insights revealed by comparative transcriptomics and antibacterial effectiveness of the biogenic Se⁰ nanoparticles / Y. Wang, Q. Ye, Y. Sun [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. Art. 845321.

Selenite reduction by the rhizobacterium *Azospirillum brasilense*, synthesis of extracellular selenium nanoparticles and their characterisation / A. V. Tugarova, P. V. Mamchenkova, V. A. Khanadeev, A. A. Kamnev // *New Biotechnology*. 2020. Vol. 58. P. 17–24.

Tugarova A. V., Kamnev A. A. Proteins in microbial synthesis of selenium nanoparticles // *Talanta*. 2017. Vol. 174. P. 539–547.

ПЕРВЫЕ СВЕДЕНИЯ О ПИГМЕНТНОМ СОСТАВЕ *NOSTOC COMMUNE* ИЗ АНТРОПОГЕННО-НАРУШЕННЫХ ТЕРРИТОРИЙ ПРЕДБАЙКАЛЬЯ

Г. С. Тупикова, И. Н. Егорова, О. В. Шергина

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
Иркутск, shambueva93galina@mail.ru

Nostoc commune – является diaзотрофным, окислительным фотосинтезирующим организмом. Изучение состава пигментов этого вида является важным для понимания особенностей его функционирования. Сведения о пигментном составе *Nostoc commune* немногочисленны [Briones-Nagata, Martines-Goss, Hori, 2007; Потенциал природных ... , 2013; Recovery of photosynthetic ... , 2002; и др.]. Большинство исследований проводилось с культивируемым материалом, единичны данные по содержанию пигментов в природных образцах вида.

Нами был изучен пигментный состав ностока, собранного на территориях с разным уровнем антропогенной нарушенности. Талломы ностока были отобраны вблизи автотрасс и техногенного отвала (окр. с. Баяндай, г. Иркутск и г. Усолье-Сибирское), а также в окрестностях с. Большое Голоустное – территории со слабой антропогенной нарушенностью. Определение содержания хлорофиллов и каротиноидов проводили спектрофотометрическим методом [Wettstein, 1957].

Установлено, что в ностоке из Предбайкалья отмечается сильная вариабельность содержания пигментов: хлорофилл «а» ($23,85 \pm 6,36$), хлорофилл «б» ($8,39 \pm 3,26$), каротиноиды ($21,09 \pm 6,80$). Концентрация пигментов в талломах ностока из антропогенно-нарушенных территорий варьировало в пределах: от 16–41 мг/г с. м. для хлорофилла «а», от 1–6 мг/г для хлорофилла «б» и от 8–35 мг/г для каротиноидов. В образцах вида из менее нарушенной территории регистрировали от 9–24 мг/г хлорофилла «а», от 5–10 мг/г хлорофилла «б» и от 9–18 мг/г каротиноидов. В талломах вида из загрязненных территорий регистрировали повышенное содержание всех пигментов (в 1,3–1,5 раза) по сравнению с содержанием пигментов в ностоке из менее нарушенной территории.

Полученные нами данные по содержанию хлорофилла «а» сопоставимы с содержанием этого пигмента в культивируемом *N. commune* из России (Кировская область) (7–22 мг/г) [Потенциал природных ... , 2013]. В культуре ностока из Японии и Филиппин регистрировали низкое содержание хлорофилла «а» (2–4,5 мг/г.) [Briones-Nagata, Martines-Goss, Hori, 2007]. По сравнению с другими представителями культивируемых цианобактерий: *Anabaena variabilis* (C_a – 13 мг/г; C_b – 8 мг/г; $C_{кар.}$ – 2 мг/г), *Nostoc calcicola* (C_a – 13 мг/г; C_b – 9 мг/г; $C_{кар.}$ – 3 мг/г) [Физиолого-биохимические свойства ... , 2024 и др.], содержание хлорофилла «а» и каротиноидов в *N. commune* из Предбайкалья было в разы выше.

Следует отметить, что это первые полученные нами данные. Исследования представляют большой интерес и должны быть продолжены.

Литература

Потенциал природных биопленок *Nostoc commune* как сорбентов тяжелых металлов в водной среде / Е. А. Горностаева [и др.] // Вода: Химия и экология. 2013. № 1. С. 93–101.

Физиолого-биохимические свойства микроводорослей в условиях загрязнения ионами тяжелых металлов меди, кобальта, кадмия и свинца / Г. Х. Кадырова [и др.] // Universum: химия и биология. 2024. № 116. С. 22–28.

Briones-Nagata M. V., Martinez-Goss M. R., Hori K. A comparison of the morfo-cytology and chemical composition of the two forms of the cyanobacterium, *Nostoc commune* Vauch., from the Philippines and Japan // J. Appl Phycol. 2007. N 19. P. 675–683.

Recovery of photosynthetic systems during rewetting is quite rapid in a terrestrial cyanobacterium, *Nostoc commune* / K. Satoh, M. Hirai, J. Nishio [et al.] // Plant and Cell Physiology. 2002. Vol. 43. P. 418–423.

Wettstein D. Chlorophyll – letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden // Experimental Cell Research. 1957. Vol. 12, N 3. P. 427–506.

ИЗМЕНЕНИЕ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АБОРИГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ВНЕСЕНИИ В ПОЧВУ ЛЁГКОЙ ПЛАСТОВОЙ НЕФТИ

**А. А. Худоков, А. А. Самков, Н. Н. Волченко,
Е. В. Моисеева, М. Н. Круглова, Э. В. Карасёва**

Кубанский государственный университет
г. Краснодар, sashokas@yandex.ru

Экологическая система поддержания гомеостаза почвы должна включать в себя определенную величину разнообразия биоты и биогеоценологических связей. Сложные системы обладают лучшей устойчивостью и меньшей уязвимостью к негативным факторам. Растущая с каждым годом антропогенная нагрузка на почву приводит к уменьшению биоразнообразия, а также является одним из основных факторов общей деградации почвенного покрова [Булахов, 2003]. При загрязнении почв нефтью происходит увеличение численности бактерий, но уменьшение численности и качества микромицетов. По степени возрастания представителей их располагают следующим образом: грибы (увеличение от 0,5 до 2 раз), спорообразующие бактерии (увеличение в 2 раза), аммонифицирующие микроорганизмы (увеличение от 2 до 5 раз), актиномицеты (увеличение от 1,5 до 20 раз). К главной причине роста при загрязнении можно отнести поступление дополнительного источника углерода для гетеротрофных нефтеокисляющих микроорганизмов, при этом чувствительная к нефти микрофлора погибает. Но при высоких концентрациях углеводов (более 10 % от массы почвы) негативное воздействие оказывается на всех без исключения представителей микроорганизмов [Бородулина, Полонская, 2011]. Аборигенная микрофлора почвы способна утилизировать

нефтяные загрязнения, не превышающие предельно допустимой экологической нагрузки. Благодаря этому система способна к самоочищению и самовосстановлению (Lednev, 2021). Данный процесс основывается за счет вовлечения в метаболизм внутриклеточного окисления нефти и нефтепродуктов. Микроорганизмы начинают перестраивать ферментативную активность следующим образом: уменьшается активность одних ферментов (каталазы, протеазы, дегидрогеназы, полифенолоксидазы), но в то же время увеличивается активность других ферментов, например, пероксидазы, уреазы, инвертазы, целлюлазы [Ферментативна активність ... , 2013].

Для оценки нативного нефтеокисляющего потенциала аборигенной микрофлоры было отобрано 5 образцов почв различных типов. На первом этапе проводили оценку нефтеокисляющей активности почвенных бактерий по отношению к легкой нефти, углеводородный состав которой представлен на рис. 1.

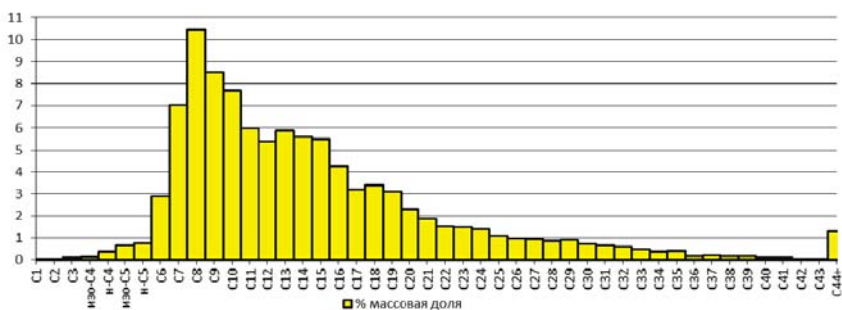


Рис. 1. Углеводородный состав легкой нефти

При разливах нефти и нефтепродуктов биорекультивация проводится не сразу, некоторое время аборигенное микробное сообщество подвергается воздействию нефтепродуктов, что может приводить к угнетению либо интенсификации тех или иных метаболических процессов. В связи с этим изучали влияние 1 % легкой пластовой нефти на адаптационные возможности аборигенного микробного сообщества. Для этого в пять образцов почв вносили стерильную пластовую нефть и экспонировали в течение 4 сут. По окончании эксперимента оценивали нефтеокисляющую активность аборигенных нефтеокисляющих микроорганизмов. Сравнительная нефтеокисляющая активность аборигенной микробиоты почвенных образцов до добавления 1 % легкой пластовой нефти и через 4 сут. после добавления 1 % легкой пластовой нефти представлена на рис. 2.

Изначально степень деструкции легкой пластовой нефти была низкой и максимально составляла 25 % (микроорганизмами в образцах почв № 2 и № 3), при использовании микробного сообщества образцов почв № 1, № 4, № 5 деструкция легкой пластовой нефти не наблюдалась. По

окончании эксперимента нефтеокисляющая активность микробиоты в образцах почв № 2 и № 3 увеличилась на 50 %, в образцах почв № 2 и № 3 – на 25 %. Максимальное увеличение нефтедеструкции было зафиксировано в образце почвы № 1 – на 75 %. Таким образом, через 4 сут. после добавления 1 % нефти в образцы почв отмечали адаптацию автохтонной микробиоты к поллютанту, проявляющуюся в увеличении нефтеокисляющего потенциала (деструкция нефти увеличивалась от 25 до 75 %).

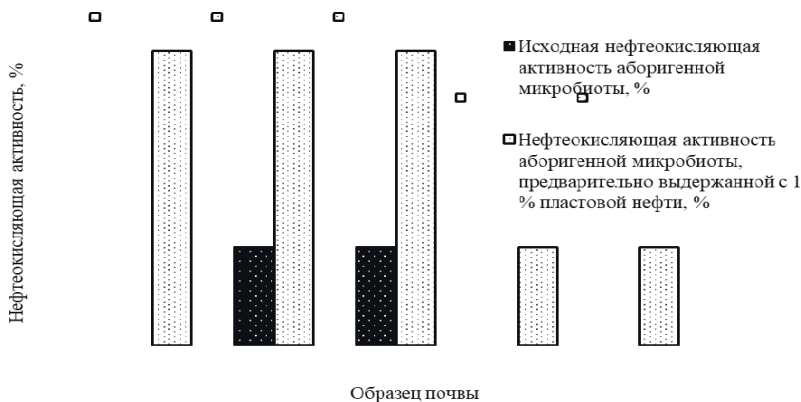


Рис. 2. Нефтеокисляющая активность аборигенной микробиоты почвенных образцов до добавления 1 % легкой пластовой нефти и через 4 сут. после добавления 1 % легкой пластовой нефти

Литература

- Бородулина Т. С., Полонская Д. Е. Влияние уровня нефтезагрязнения на состав почвенных микроорганизмов // Вестник КрасГАУ. 2011. № 7. С. 47–52.
- Булахов В. Л. Биоразнообразие как функциональная основа экосистем // Вісник дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. 2003. № 11. С. 3–8.
- Ферментативна активність нафтозабрудненого ґрунту в кореневій зоні рослин Carex Hirta L. / Л. В. Буньо, О. Л. Карпин, О. І. Терек, О. М., Цвілінюк // Ґрунтознавство. 2013. Вип. 14, № 3. С. 43–51.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО ИСТОЧНИКА АЗОТА ДЛЯ РОСТА И РАЗВИТИЯ *NODULARIA* SP.

Д. Д. Цыренова, Э. В. Данилова, Д. Д. Бархутова

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Улан-Удэ, baldanovad@rambler.ru

Роль азотфиксации в почве велика и заключается в трансформировании молекулярного азота в доступную для других организмов форму и включении его в биологический круговорот. Среди многообразия биоты фиксировать молекулярный азот могут исключительно прокариотические формы, в том числе цианобактерии. Эта уникальная способность позволяет цианобактериям выживать в различных экстремальных экосистемах (Цианобактерии, 1990). У большинства цианобактерий азотфиксация происходит в специализированных клетках – гетероцистах (Кондратьева, 1996; Давыдов, 2010). В качестве источников азота цианобактерии используют аммоний, нитраты и мочевины.

Известно более 200 родов азотфиксирующих гетероцистных нитчатых цианобактерий. Способность к фиксации азота отмечена и у цианобактерий, не образующих гетероцисты, например, у некоторых представителей родов *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Lyngbya* и др. (Кондратьева, 1996; Prasanna et al., 2014). По данным Е. М. Панкратовой [1979], накопление азота для почв умеренной зоны, за счет азотфиксации цианобактерий, составляет от 2 до 51 кг/га в год.

Целью данной работы являлось подбор и выявление оптимального источника азота для роста и развития азотфиксирующей гетероцистной культуры *Nodularia* sp. в лабораторном эксперименте.

Культура *Nodularia* sp. была выделена из сухой корки содово-соленого оз. Хилганта (Забайкальский край), в засушливый период (2006 г.). Уровень воды в озере подвержен значительным колебаниям, обусловленным климатическими особенностями региона. Отмечены циклические изменения годовой суммы атмосферных осадков – с 1965 по 1998 г. наблюдался цикл, включающий «сухую» и «влажную» фазы. С 1999 по 2021 г. в регионе наблюдалась тенденция к снижению годовой суммы атмосферных осадков, с более высокой температурой воздуха [Обязов, 2007]. Начиная с 2022 г. наблюдались обильные дожди, озеро начало наполняться водой, что говорит о возможном начале «влажного» периода.

В качестве источников азота были выбраны 5 % растворы NH_4Cl , NaNO_3 и атмосферный азот. Культивирование проводили при различных концентрациях карбонатов и хлоридов в среде.

В первом эксперименте в качестве источника азота в среду добавляли 5 % раствор NH_4Cl . Визуальная оценка роста при различных концентрациях карбонатов показало, что при концентрациях от 1–100 г/л рост культуры был медленным. Однако отмечен рост культуры при более высоких

концентрациях: 125 и 150 г/л. Ранее не отмечалось развитие гетероцистных культур цианобактерий при таких высоких значениях концентрации карбонатов. Известные в литературе культуры *Nodularia* способны развиваться при солености не выше морской [Characterization of *Nodularia* ... , 2000]. При различных концентрациях NaCl рост культуры не наблюдался.

Во втором эксперименте источником азота служил 5 % раствор NaNO₃. Рост культур наблюдался при концентрациях карбонатов от 1 до 75 г/л, с оптимумом при 1 г/л. При различных концентрациях хлорида натрия в среде культура росла вплоть до 75 г/л, с оптимум при 1 и 50 г/л.

Третий эксперимент проводили без добавления азота, процесс азотфиксации происходил в присутствии атмосферного азота. Необходимо отметить, что культура росла активно. Диапазон роста при различных концентрациях карбонатов был широким от 1–125 г/л, с оптимум при 1 г/л. Диапазон роста при различных концентрациях NaCl был немного меньше, чем с карбонатами: от 1–75 г/л. Оптимум отмечен при 10 и 25 г/л.

Таким образом, экспериментально было выявлено, что наиболее характерными и доступными источниками азота для гетероцистной культуры S 134 являлись как нитрат натрия, так и молекулярный азот, фиксируемый культурой из атмосферы. В случае добавления нитрата аммония в среду в качестве источника азота рост культуры был медленным, хотя и наблюдался при высоких концентрациях.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121030100229-1.

Литература

Обязов В. А. Изменения температуры воздуха и увлажненности территории Забайкалья и приграничных районов Китая // Природоохранное сотрудничество Читинской области (Российская Федерация) и автономного района внутренняя Монголия (КНР) в трансграничных экологических районах : материалы конф. Забайкал. гос. гум.-пед. ун-та. Чита. 2007. С. 247–250.

Панкратова Е. М. Участие азотфиксирующих водорослей в накоплении азота в почве // Изв. АН СССР. Серия: Биология. 1979. № 2. С. 188–197.

Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods / J. Lehtimäki, C. Lyra, S. Suomalainen [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. Vol. 50. P. 1043–1053.

РОЛЬ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В АДАПТАЦИИ МОРСКИХ ГРИБОВ К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Е. А. Юрченко, А. Н. Юрченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН
Владивосток, eurch@piboc.dvo.ru

Вторичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, продуцируемые микро- и макроорганизмами под контролем специфических генов. Кластеры генов вторичного метаболизма грибов контролируются сложной регуляторной сетью, включающей взаимосвязанные подсети, состоящие из множества белков и комплексов, которые реагируют на различные стимулы. В отличие от первичных метаболитов, эти соединения не регулируют непосредственно рост организмов, которые их продуцируют, но участвуют в регуляторной реакции на воздействие различных факторов окружающей среды. При этом их роль в организме-продуценте и то, какую биологическую активность эти вещества потом проявляют в различных *in vitro* и *in vivo* экспериментах, не всегда совпадает. Для человека афлатоксины токсичны, для грибов эти соединения – реакция на окислительный стресс и собственные антиоксиданты.

Морские грибы оказываются под воздействием таких факторов окружающей среды как давление, соленая вода, температура, недостаток кислорода. Это, очевидно, потребовало определенной адаптации, что привело к тому, что нередко из морских грибов выделяются такие вторичные метаболиты, которые не продуцируются наземными. Биологическая роль этих соединений не всегда ясна, но их биологическая активность активно изучается. Например, из облигатного морского гриба *Asteromyces cruciatus* КММ 4696 был выделен акруцихинон С – единственный на данный момент представитель антрахиноновых производных с 6/6/5 циклической системой. В экспериментах *in vitro* для него была показана слабая антимикробная активность, но его биологическая роль не ясна, хотя и очевидно связана с адаптацией гриба к солености морской воды – ведь антрахиноны рассматриваются как хелаторы в ответе грибов на *metal stress*.

Понимание роли тех или иных вторичных метаболитов в жизнедеятельности гриба может помочь так изменить условия его лабораторного культивирования, чтобы гриб был вынужден увеличить продукцию этих соединений. Это, несомненно, ценно с практической точки зрения и делает морские грибы уникальными поставщиками ценных биологически активных соединений.

Исследование поддержано грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научнотехнической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1052).

Секция 4.2
АДАПТАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
К УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ХОЗЯИНА
(ЖИВОТНОЕ, ЧЕЛОВЕК)

ТИПИРОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ
ЧЕЛОВЕКА

Н. Л. Белькова

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
Иркутск, nibelkova@gmail.com

Понимание взаимосвязи микробиома человека с риском и прогрессированием заболеваний является важнейшей задачей для современной медицины. Эта информация, систематизированная в виде индивидуальных микробных профилей/паттернов или сигнатур, может иметь клиническую значимость для прогнозирования модели заболеваний, что будет способствовать эффективной профилактической терапии и персонализированному подходу в лечении. Целью настоящего исследования стал поиск и систематизация факторов, определяющих и влияющих на состав, структуру и разнообразие микробиоты кишечника человека.

Совокупность микробов в организме человека имеет ряд особенностей, которые позволяют характеризовать эту сложную экосистему как самодостаточный микробный орган. В пределах каждого биотопа (кожа, кишечник, ротовая полость и др.) микробиота представляет собой функциональную единицу, устойчивую в здоровом организме, но изменяющуюся как в течение жизни человека за счет сбалансированного развития отдельных представителей, выполняющих сходные функции [Diversity, stability and ... , 2012; Gut microbiome stability ... , 2021], так и при различных заболеваниях [Next steps after ... , 2022]. С одной стороны, учитывая высокое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с разными биотопами организма человека, актуальными являются подходы к стратификации и типированию микробиоты [Enterotypes of the human ... , 2011, Gopinath, Iwasaki, 2015]. С другой стороны, рассматривая микробное сообщество кишечника как экологическую систему, необходимо оценить факторы различные факторы, которые потенциально могут оказывать влияние на его формирование и развитие.

Известно, что стабильность и устойчивость любого микробного сообщества обеспечивается разнообразием составляющих его микроорганизмов, их метаболической «гибкостью», функциональной избыточностью и формированием межмикробных взаимодействий [Gut microbiome stability ... , 2021]. Со стороны хозяина контроль взаимодействий с микробиотой осуществляется за счет различных селективных факторов, таких как предоставляемые питательные вещества, иммунная толерантность, защита слизистым слоем, перистальтические движения, контроль уровня кислорода [The evolution of the ... , 2017]. В этом контексте, функционально здоровый микробиом должен представлять не статическое состояние, а динамическую экосистему со способностью восстанавливаться до состояния равновесия после любой стрессовой нагрузки. Однако при длительном стрессе, когда стабильность здорового состояния микробиома нарушается, могут развиваться патологические, но относительно стабильные состояния с отрицательными последствиями для человека, которые характеризуют определенный тип микробного сообщества при определенном заболевании – патобиом. Так, М. Fassarella с соавторами, рассматривая варианты устойчивости микробиома взрослого человека, выделяет три стабильных состояния микробиома кишечника: здоровое, альтернативное, но здоровое и нездоровое [Gut microbiome stability ... , 2021]. Развивая эту идею, можно предположить, что стабильные состояния кишечного микробиома могут быть как в здоровом, так и в патологическом виде, занимая при этом энергетически выгодные состояния в виде потенциальных ям (рис.). Альтернативное состояние является нестабильным и не может быть устойчивым, потому что под воздействие внешних и внутренних факторов происходит перестройка структуры кишечного микробиома. По результатам этой перестройки из альтернативного или переходного состояния кишечная микробиота может либо восстановиться до своего исходного здорового состояния, либо перейти в патологическое состояние, стабильность обеспечивается патофизиологическими факторами, характерными для того или иного заболевания. Очевидно, что в зависимости от особенностей этих факторов состав и структура кишечного патобиома может варьировать. Таким образом, при различных заболеваниях можно охарактеризовать специфичные для них микробиом-ассоциированные маркеры.

Кроме того, не следует недооценивать влияние таких факторов как генетика хозяина на состав микробиома [Large-scale association ... , 2021]. Полногеномные ассоциативные исследования (GWAS) позволяют идентифицировать десятки локусов, которые могут быть связаны с представленностью определенных бактериальных таксонов, и в настоящее время происходит накопление фактических данных, полученных в разных популяциях и для различных заболеваний. Авторы обсуждают технические сложности в воспроизводимости полученных результатов, методологические различия в сборе, обработке и аннотации кишечной микробиоты в

разных исследованиях, при этом отмечают, что некоторые сигналы GWAS, связанные с составом микробиома, могут быть популяционно-специфичными, т. е. они могут представлять собой настоящие популяционные различия в генетической структуре и/или окружающей среде.

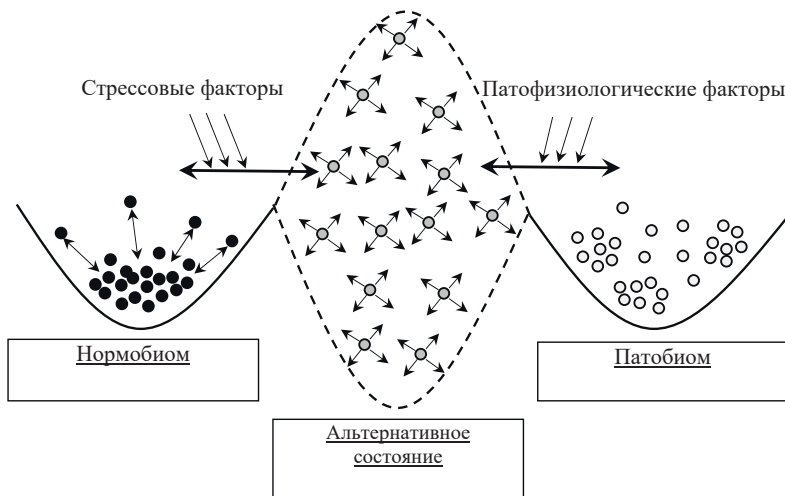


Рис. Схема устойчивости кишечного микробиома в норме и при патологии

Литература

- Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota / C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, R. Knight // *Nature*. 2012. Vol. 489, N 7415. P. 220–230.
- Enterotypes of the human gut microbiome / M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier [et al.] // *Nature*. 2011. Vol. 473, N 7346. P. 174–180.
- Gopinath S., Iwasaki A. Cervicovaginal microbiota: simple is better // *Immunity*. 2015. Vol. 42, N 5. P. 790–791.
- Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health / M. Fassarella, E. E. Blaak, J. Penders [et al.] // *Gut*. 2021. Vol. 70, N 3. P. 595–605.
- Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition / A. Kurilshikov, C. Medina-Gomez, R. Bacigalupe [et al.] // *Nat Genet*. 2021. Vol. 53, N 2. P. 156–165.
- Next steps after 15 stimulating years of human gut microbiome research / T. Clavel, H. Horz, N. Segata, M. Vehreschild // *Microb Biotechnol*. 2022. Vol. 15, N 1. P. 164–175.
- The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash / K. R. Foster, J. Schluter, K. Z. Coyte, S. Rakoff-Nahoum // *Nature*. 2017. Vol. 548, N 7665. P. 43–51.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ *FRANCISELLA TULARENSIS* К СТРЕСС-ФАКТОРАМ

С. В. Борисова, О. А. Волох

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Саратов

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, для возбудителя которой, *Francisella tularensis*, характерен широкий круг хозяев и переносчиков, обитающих в разных природных зонах, несколько путей передачи и способность реплицироваться в эукариотических клетках. Это связано с тем, что возбудитель туляремии обладает факторами вирулентности, которые направлены на инактивацию механизмов естественной противoinфекционной резистентности и минимизируют вред от внешнего воздействия. В то же время *F. tularensis* отличается требовательностью к питательным средам и длительностью культивирования, что ограничивает использование микробиологических методов при изучении факторов, не обладающих бактерицидным или бактериостатическим действием.

Целью работы являлось экспериментальное обоснование возможности использования комплекса микробиологических, биофизических и молекулярно-генетических методов для изучения воздействия стресса на клетки *Francisella tularensis* на популяционном, клеточном и молекулярном уровнях.

Исследования проводили на панели из 8 штаммов *F. tularensis* подвидов *holarctica*, *tularensis*, *novicida*, *mediasiatica*. В качестве стресс-воздействия использовали комплексный стресс: температурный и перекисный, имитирующий условия в фаголизосомах клеток хозяина. Для создания такого стресса использовали повышение температуры до 42 °С и добавление H₂O₂ до конечной концентрации 5мМ. Оценку жизнеспособности бактериальной культуры проводили путем высева на чашки с агаром для культивирования туляремийного микроба FT (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Бульонную культуру последовательно разводили в физиологическом растворе и высевали на чашки 100 КОЕ. Учет количества выживших колоний проводили через 48 ч. Электрооптический анализ проводили на автоматическом электрооптическом анализаторе бактериальных клеток EloTrace 3.0 (EloSystems, Германия) в режиме реального времени. Емкость с культурой подсоединяли к анализатору и проводили измерения АП бактериальных клеток до и после стресс-воздействия. Для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) ранее были разработаны специфичные экспериментальные праймеры и зонды [Борисова, Тучков, Волох, 2022]. Анализ экспрессии генов стресса туляремийного микроба проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q. Программа амплификации была оптимальной для используемых праймеров:

95 °С – 5 мин, затем 40 циклов, включающих денатурацию кДНК при 95 °С – 30 с, отжиг праймеров при 55/56/63 °С – 30 с, синтез комплементарной цепи при 72 °С – 30с.

Было установлено, что воздействие пероксида водорода совместно с повышением температуры до 42 °С в течение 2 ч снижает жизнеспособность туляремийного микроба, в среднем, на 50 %. Причем этот показатель у вирулентных штаммов, таких как *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 и *F. tularensis* subsp. *nearctica* В-399 А'Cole (DCL = 1м. кл), был, в среднем, на 15 % выше, чем у авирулентных штаммов, включая вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ.

При изучении воздействия стресс-условий на показатели анизотропии поляризуемости (АП) методом электрооптического анализа использовались ранее подобранные параметры частот ориентирующего поля – 900 и 2100кГц, которые характеризуют состояние цитоплазмы и цитоплазменной мембраны соответственно [Электрооптический анализ ... , 2020]. Было показано, что изменение показателей АП у всех подвидов происходило в первые минуты после действия стресс-условий, после чего происходила их плавная нормализация. По окончании двух часов, значения АП значительно снизились по сравнению с показателями до стресса, что говорит о повреждении бактериальных клеток. Было показано, что показатели АП и жизнеспособности на чашках коррелировали между собой независимо от подвида. Таким образом, данный метод является универсальным для всех подвидов *F. tularensis*.

Ранее нами были сконструированы наборы праймеров и зондов к генам секретируемых стресс-белков туляремийного микроба GroEl/GroEs и Vfr, а также к сигма-фактору groH, который является индуктором генов реакции на температурный и окислительный стресс. В рамках данного исследования мы изучали, как стресс-воздействие будет влиять на экспрессию данных генов, и как их экспрессия будет зависеть друг от друга.

Было показано, что уровень экспрессии *rpoH* резко возрастал в первые 30 мин после повышения температуры и добавления H₂O₂. Это происходило независимо от подвида, а уровень экспрессии гена был выше в 10 раз относительно контроля. Далее, его экспрессия снижалась и оставалась на уровне, в 2 раза превышающем контроль. Вместе с *rpoH* возрастала активность и гена *groEl*, экспрессия гена возросла в 20 раз и не снижалась до конца эксперимента. Было показано, что экспрессия *groEl* была зависима от роста экспрессии *rpoH*, что согласуется с литературными данными [Pivotal role of the ... , 2009]. Такая активность этих генов говорит о том, что они необходимы при выживании в организме хозяина и способствуют успешной персистенции в макрофагах. Экспрессия гена *bfr* так же повышалась при изменении условий культивирования, но эти изменения были незначительны. Так же, не было обнаружено корреляции с экспрессией остальных двух генов. Для *bfr* максимум экспрессии (возрастание в 3 раза) приходился на 1–60 мин после стресс-воздействия, после

чего уровень экспрессии гена снизился до исходных значений. Так же, было отмечено, что экспрессия *bfr* не коррелировала с двумя другими генами. Такой феномен может быть связан с тем, что ген *bfr*, в отличие от *groEl*, не регулируется *rpoH*, что согласуется с литературными данными [Pivotal role of the ... , 2009].

Таким образом, использование современных методов для изучения влияния стресс-условий на клетки туляремийного микроба позволяет оценить степень воздействия на популяционном, клеточном и молекулярном уровнях. Применение комплексного методического подхода возможно для определения момента выхода стресс-белков в окружающую среду с целью их получения. Полученные данные говорят о том, что все представленные методы способны работать независимо от подвида туляремийного микроба, а время получения результатов гораздо меньше, чем у стандартного чашечного метода – в случае с электрооптическим анализом результаты возможно получить сразу, для ОТ-ПЦР срок получения результата составляет 12 ч.

Литература

Борисова С. В., Тучков И. В., Волох О. А. Разработка способа детекции генов стресс-белков *Francisella tularensis* // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2022 : сб. материалов конгресса с Междунар. участием, Москва, 27–28 апр. 2022 г. М. : ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. С. 231.

Электрооптический анализ жизнеспособности клеток вакцинного штамма туляремийного микроба / О. А. Волох, С. В. Борисова, Д. Н. Бибилов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 3. С. 50–55.

Pivotal role of the *Francisella tularensis* heat-shock sigma factor RpoH / N. Grall, J. Livny, M. Waldor [et al.] // Microbiology. 2009. Vol. 155. P. 2560–2572.

ВАРИАНТЫ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА У ПОДРОСТКОВ С ОЖИРЕНИЕМ

**Е. С. Клименко, Н. Л. Белькова, А. В. Погодина,
М. А. Даренская, Л. В. Рычкова**

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
г. Иркутск, klimenko.elizabet@gmail.com

В настоящее время все больше исследований показывают, что микробиом кишечника тесно связан с ожирением, а кишечные бактерии могут влиять на метаболизм человека [Gupta, Osadchiy, Mayer, 2020]. Поскольку разнообразие микроорганизмов в кишечнике человека относительно невысоко, проводится типирование композиционных паттернов этих видов бактерий в разных возрастных когортах населения. Развивая концепцию энтеротипа, направленную на стратификацию кишечных микробиомов человека, проведены исследования кишечной микробиоты подростков с ожирением и нормальной массой тела.

Ранее мы описывали особенности микробиома кишечника у подростков, страдающих ожирением, на основании секвенирования ампликонов V3-V4 фрагмента гена 16S [Разнообразие и метаболический ... , 2021; Различия в составе ... , 2022]. Всего в исследование вошли 125 подростков – 59 подростков с нормальной массой тела и 66 подростков с ожирением. Группы сформированы из числа подростков, проходивших обследование в Клинике ФГБНУ НЦ ПЗСПЧ (Иркутск). Критерии включения в исследование: наличие ожирения (SDS ИМТ>2) или нормальной массы тела (SDS ИМТ>–2, но < 1). Критерии исключения: антибактериальная терапия в течение предшествующих 3 мес.; кишечные инфекции, перенесённые в течение предшествующих 6 мес.; наличие хронических воспалительных заболеваний кишечника и/или другой тяжёлой соматической патологии, лечение пре- и/или пробиотиками в течение предшествующих 6 мес.

Кишечный микробиом в основном был представлен филумами Bacteroidota (46,35±1,88 %), Bacillota (43,17±2,14 %), Pseudomonadota (7,45±0,83 %) и Actinomycetota (1,90±0,57 %). Филум Bacteroidota был представлен в основном такими родами, как *Bacteroides*, *Prevotella* и *Alistipes*, которые являются доминантными членами бактериального сообщества кишечника. Для Bacillota было характерно наличие *Dialister* и таксономических групп Ruminococcaceae UCG-002 и [*Eubacterium coprostanoligenes*]. В составе филума Pseudomonadota присутствовали *Sutterella*, *Serratia* и таксономическая группа *Escherichia-Shigella*, а среди Actinomycetota определены представители *Bifidobacterium* и *Collinsella*.

Таблица

Распространенность типов кишечного сообщества в выборке пациентов

Тип сообщества	Доминирующий таксон	Пациенты с нормальной массой тела	Пациенты с ожирением
В	<i>Bacteroides</i>	36	20
Р	<i>Prevotella</i>	10	7
Смешанный	Два и более таксона, имеющих схожие доли	13	39*

*Частота встречаемости смешанного типа выше в группе подростков с ожирением ($\chi^2 = 17,765; p < 0,05$)

Нами было проведено типирование сообществ по доминантному компоненту – степени представленности доминирующих таксонов. Были выделены три группы: в первой доминирующим таксоном был род *Bacteroides*, во второй – *Prevotella* и третья группа была представлена смешанным вариантом сообщества, при котором два и более таксона имеют сопоставимую представленность в консорциуме (табл.).

Распространенность типа В в выборке составила 44,8 % (56 из 125), типа Р – 13,6 % (17 из 125), а смешанного типа – 41,6 % (52 из 125). Помимо этого, смешанный тип кишечного сообщества почти в три раза чаще встречается у пациентов с ожирением ($n = 39$), чем у пациентов с нормальной массой тела ($n = 13$).

Таким образом, наблюдается взаимосвязь между смешанным типом кишечного сообщества и ожирением у подростков.

Литература

Различия в составе и метаболизме кишечной микробиоты: пилотное исследование подростков с нормальной массой тела и ожирением / Е. С. Клименко, Н. Л. Белькова, А. И. Романица, [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173, № 5. С. 597–601.

Разнообразие и метаболический потенциал кишечного микробиома подростков с функциональным расстройством кишечника / Е. С. Клименко, Н. Л. Белькова, А. И. Романица, [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2021. Т. 172, № 12. С. 675–680.

Gupta A., Osadchiy V., Mayer E. A. Brain-gut-microbiome interactions in obesity and food addiction // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. 2020. Vol. 17. P. 655–672.

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ – ИСТОЧНИК МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* С ВЫСОКИМ ТРАНСМИССИВНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

В. С. Михайловская¹, М. Starčič Erjavec², М. В. Кузнецова¹

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, veranikamihailovskaja@yandex.ru, mar19719@yandex.ru

²University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, marjanca.starctic.erjavec@bf.uni-lj.si

Широкое использование антимикробных препаратов в медицинской и ветеринарной практике привело к появлению мультирезистентных (МЛУ) патогенов. Благодаря высокой генетической пластичности *Escherichia coli* является одной из основных бактерий, участвующих в распространении лекарственной устойчивости в клинике, сельском хозяйстве и окружающей среде [Wei et al., 2019]. Эти бактерии обмениваются генетическим материалом посредством мобильных элементов – интегров, транспозонов и плазмид, играющих важную роль в формировании пула культур с фенотипом МЛУ с высоким зоонозным потенциалом в условиях сельскохозяйственных предприятий. **Цель исследования** – оценить распространенность мобильных генетических элементов и эффективность конъюгативного переноса у штаммов *E. coli*, изолированных от сельскохозяйственных животных.

Методы и материалы. В работе были использованы штаммы *E. coli*, выделенные из фекалий крупного рогатого скота ($n = 49$), свиней ($n = 3$), кроликов ($n = 4$), сельскохозяйственных птиц ($n = 16$) и органов кур с признаками колибактериоза ($n = 28$) предприятий промышленного животноводства Пермского края. Методом ПЦР детектировали ген-регулятор конъюгативного переноса *traJ* (F: TCCAAAAATGATGATGAAT, R: ATAGGAACCTCCTCACAAAG), консервативный фрагмент интегонов 1 класса *int1* (F: GGCATCCAAGCAGCAAG, R: AAGCAGACTTGACCTGA). Наличие

бактериофага в клетках определяли с помощью метода индукции УФ-излучением. Определение чувствительности штаммов к 11 антибиотикам проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (МАКМАХ, Версия-2018-03). Резистентность штаммов хотя бы к одному препарату трех и более классов антибиотиков была определена как МЛУ [Multidrug-resistant, extensively ... , 2012]. В конъюгативном тесте для оценки донорной способности *E. coli* были отобраны резистентные к ампициллину, чувствительные к гентамицину, содержащие ген *traJ* полевые штаммы. В качестве реципиента использовали *E. coli* N4i с хромосомно-опосредованной устойчивостью к гентамицину. Для оценки реципиентной способности отбирали культуры, устойчивые к ампициллину, чувствительные к хлорамфениколу и гентамицину, а в качестве донора использовали рекомбинантный штамм *E. coli* N4i, несущий плазмиду рОХ38:Сm^r. Конъюгативный перенос проводили в планктонной культуре. Частоту конъюгации оценивали как отношение числа колоний трансконъюгантов к числу колоний реципиентов [Transfer of plasmid-mediated ... , 2009].

Результаты. *E. coli* с фенотипом МЛУ были выделены из фекалий крупного рогатого скота и сельскохозяйственных птиц с частотой 32,7 % (16/49) и 18,8 % (3/16) соответственно. Обнаружена большая доля таких культур в образцах органов птиц с признаками системного колибактериоза – 75 % (21/28). Интегроны детектировали у 12,2 % (6/49) штаммов *E. coli*, выделенных от крупного рогатого скота, 18,8 % (3/16) – от здоровых сельскохозяйственных птиц, 28,6 % (8/28) – от птиц с признаками колибактериоза и не выявлены среди *E. coli* свиней и кроликов. В вышеупомянутых группах бактериофаги были обнаружены в 32,7 % (16/49), 37,5 % (6/16), 7,1 % (2/28), 66,7 % (2/3) и 25 % (1/4) случаев, соответственно. Важно отметить высокую распространенность штаммов с конъюгативными плазмидами в четырех группах: 59,2 % (29/49), 50 % (8/16), 53,6 % (15/28) и 100 % (3/3), тогда как кроличьи *traJ*⁺ штаммы не были обнаружены. Среди *E. coli*, выделенных от крупного рогатого скота, МЛУ культуры чаще содержали интегроны (31,3 % vs 3 %, $p < 0,001$, точный критерий Фишера), бактериофаги (68,8 % vs 15,2 %, $p = 0,01$) и *traJ* (81,3 % vs 48,5 %, $p = 0,03$), чем штаммы без фенотипа МЛУ (рис.).

Из 14 протестированных донорных фекальных штаммов *E. coli* гены устойчивости к антибиотикам были успешно перенесены путем конъюгации в *E. coli* N4i в 100 % случаев. Частота конъюгации варьировала от $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$ до $(7,9 \pm 2,6) \cdot 10^{-4}$. Следует отметить, что 64,3 % (9/14) полевых штаммов-доноров были МЛУ, причем среднее значение частоты конъюгации от доноров с МЛУ составила $2,1 \cdot 10^{-4}$, для штаммов-доноров без МЛУ – $1,3 \cdot 10^{-4}$. Аналогично, конъюгативный перенос плазмиды рОХ38:Сm^r был осуществлен во все реципиентные клетки *E. coli* ($n = 12$), его эффективность варьировала от $(5,4 \pm 7,6) \cdot 10^{-6}$ до $7,8 \pm 0,1$. Среди штам-

мов-реципиентов фенотип МЛУ имели только 2 культуры, они принимали плазмиду рОХ38:Сm^r в среднем с частотой $4,4 \cdot 10^{-5}$, для не МЛУ реципиентов частота конъюгации варьировала от $(5,4 \pm 7,6) \cdot 10^{-6}$ до $7,8 \pm 0,1$.

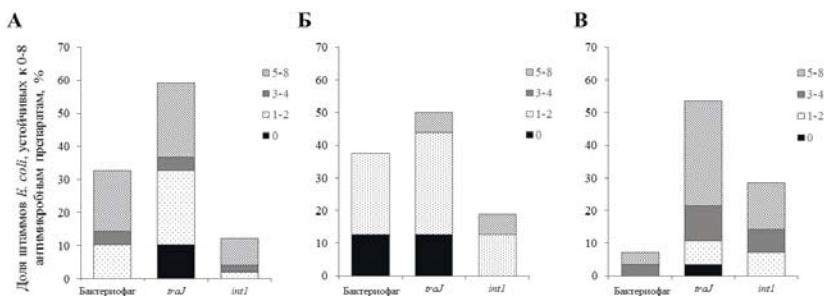


Рис. Доля изолированных из фекалий здорового крупного рогатого скота (А), сельскохозяйственной птицы (Б) или органов птиц с системным колибактериозом (В) штаммов *E. coli*, устойчивых к антибиотикам (0, 1–2, 3–4 или 5–8) и несущих мобильные генетические элементы

Данные исследования показали, что животные сельскохозяйственных предприятий представляют экологические резервуары устойчивых к антибиотикам *E. coli* с высоким трансмиссивным потенциалом. Такие культуры могут представлять высокий риск для здоровья человека, а передача генов резистентности может способствовать эволюции устойчивых к антибиотикам энтеропатогенов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ, грант № 24-24-20048 Пермский край.

Литература

- Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A. P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey [et al.] // Clin. Microbiol. Infect. 2012. Vol. 18. P. 268–281.
- Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments / E. Guglielmetti, J. M. Korhonen, J. Heikkinen [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. 2009. Vol. 293. P. 28–34.
- Transfer potentials of antibiotic resistance genes in *Escherichia* spp. strains from different sources / Y. Wei, T. Tiantian, Y. Qingxiang, R. Luqman // Chemosphere. 2020. Vol. 246. Art. 125736.

АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ОЧАГА

О. Б. Огарков¹, В. В. Синьков¹, Е. А. Орлова¹,
А. Е. Суздальницкий^{2,3}, И. Г. Кондратов¹, Н. Л. Белькова¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
Иркутск, obogarkov@mail.ru

²Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, Иркутск, irksae@mail.ru

³Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, irksae@mail.ru

Типичными поражениями туберкулеза легких являются закрытые гранулемы. Казеозный некроз в центре является отличительным признаком этой патологии. С того времени как в 1955 г. Жорж Канетти предложил 4 возможных механизма, лежащих в основе изменений казеозного туберкулезного очага, прошло почти 70 лет [Canetti, Kaufmann, 1955]: 1) высвобождение протеолитических ферментов во время вторичной нетуберкулезной инфекции; 2) реактивация протеолитических ферментов из некротизированных клеток-хозяев; 3) приток полиморфноядерных клеток; 4) сильный рост *M. tuberculosis*.

Проводимые нами исследования, так же как и работы других авторов, исключают возможность активного размножения *M. tuberculosis* в анаэробных условиях туберкулезной гранулемы [Ulrichs, Kaufmann, 2006]. Можно утверждать, что при формировании гипоксического центра туберкулезного очага в анаэробных условиях возможность для размножения имеет только ограниченное число видов бактерий [Анализ разнообразия ... , 2024; Выделение и полногеномное ... , 2023]. Общим свойством этих микроорганизмов является возможность утилизации липидов казеума в анаэробных условиях. Следует отметить, что в столь специфических условиях основным свойством формирующегося полимикробного сообщества является ограниченное видовое разнообразие и отсутствие необходимости формирования макроскопических биопленок.

Как видно из таблицы, по количеству коротких прочтений только пять образцов казеума можно отнести к классическим казеомам, с преобладанием *Mycobacteriaceae* (выделено жирным курсивом). В остальных случаях наблюдается преобладанием полимикробного сообщества, заменившего или дополнившего исходную микобактериальную микрофлору казеума. Метаболомика штаммов стафилококков и коринебактерий, выделенных нами из казеума туберкулем, позволяет предполагать, что внутри полимикробного сообщества казеума формируется патологический консорциум, способствующий усвоению липидного субстрата. Мы так же предполагаем, что внутри этого патологического сообщества может возникать явление анаэробного дыхания микроорганизмов с участием органическими субстратов в качестве конечного акцептора электронов.

Таблица

Метагеномное секвенирование *shotgun* ДНК из казеума туберкулем

№	ПЦР, казеума (уст./чув к риф.)	Размер очага (КТ), мм	Размер казеоза, мм, распад да/нет	Кальци-наты (КТ)	Инфильтрация казеума нейтрофилами	Доминирующие таксоны WGS (%)*
777	+/чув.	14×16	15/нет	да	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 32 % <i>Streptomysetaceae</i> 18 % <i>Enterobacteriaceae</i> 14 %
1010	+/чув.	18×19	17/нет	нет	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 11 % <i>Acetobacteraceae</i> 34 % <i>Enterobacteriaceae</i> 14 %
1124	отр.	27×27	25/да	нет	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 92 %
1197	+/чув.	34×34	20/да	нет	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 63 % <i>Eggerthellaceae</i> 23 % <i>Enterobacteriaceae</i> 3 %
1198	+/чув.	17×21	15/нет	нет	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 75 % <i>Staphylococcaceae</i> 11 %
1647 (i)	+/чув.	28×28	n/a	да	n/a	<i>Mycobacteriaceae</i> 96 %
1891 (ii)	+/чув.	26×26	n/a	да	n/a	<i>Mycobacteriaceae</i> 86 %
1731	+/уст	46×38	23/нет	нет	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 14 % <i>Staphylococcaceae</i> 7 % <i>Eggerthellaceae</i> 5 % <i>Enterobacteriaceae</i> 14 %
1742	+/чув.	28×28	n/a	да	n/a	<i>Mycobacteriaceae</i> 22 % <i>Eggerthellaceae</i> 24 % <i>Pseudomonadaceae</i> 22 % <i>Enterobacteriaceae</i> 7 %
1800	+/чув.	n/a	n/a	n/a	n/a	<i>Mycobacteriaceae</i> 38 % <i>Pasteurellaceae</i> 50 % <i>Streptomysetaceae</i> 5 %
1828	+/чув.	13×13	15/да	нет	Нейтрофи-лы* нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 18 % <i>Staphylococcaceae</i> 72 %
1881	+/уст	20×30	25/нет	да	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 13 % <i>Staphylococcaceae</i> 33 % <i>Streptomysetaceae</i> 15 % <i>Enterobacteriaceae</i> 8 %
1882	+/чув.	25×25	30/нет	да	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 28 % <i>Staphylococcaceae</i> 10 % <i>Eggerthellaceae</i> 5 % <i>Enterobacteriaceae</i> 10 %
10169	+/чув.	39×29	20/нет	нет	нет	<i>Mycobacteriaceae</i> 93 %

* Критерий Хи-квадрат с коррекцией по Йетсу: $\chi^2 = 9,8$; $p < 0,01$; n/a – нет данных; (i) и (ii) образцы от одного пациента во время разных операций с интервалом 6 месяца.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 23-15-00280/

Литература

Анализ разнообразия и функционального потенциала бактериальных сообществ туберкулезных очагов / Е. А. Орлова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2024. N 1. P. 29–36.

Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculostearicum*, из туберкулезного очага / О. Б. Огарков [и др.] // Acta biomedica scientifica. 2023. Vol. 8, N 4. P. 12–19.

Canetti G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man: histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis // Springer Publishing Company. 1955. Vol. 28, N 1. P. 72–73.

Ulrichs T., Kaufmann S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis // J. Pathol. 2006. Vol. 208, N 2. P. 261–269.

КОЛОНИЗАЦИОННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

В. Д. Похиленко, И. А. Дунайцев, Ю. В. Батаева, А. Р. Текутов

Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, aveatab@mail.ru

Все больше данных свидетельствует о том, что поддержание с помощью пробиотиков стабильности кишечного микробиома облегчает течение многих хронических, инфекционных, аутоиммунных заболеваний. Вместе с тем многие вопросы пробиотикотерапии остаются еще открытыми и требуют более глубокой теоретической и практической проработки. В их числе отбор и сохранение свойств штаммов пробиотиков, получение высоких выходов клеток при глубинном культивировании, стабилизация их жизнеспособности в процессах *downstream*, создание функциональных препаративных форм, обеспечивающих защиту живых клеток от пищеварительных соков, адресную доставку с последующей их пролиферацией и метаболомикой. Все эти вопросы важны для поддержания целостности микробиома с помощью приема во внутрь живых штаммов симбиотических микроорганизмов, инициирующей осуществление ими колонизационной резистентности против попавших в организм патогенов.

Для того чтобы пробиотические бактерии оставались функционально активными и жизнеспособными после проглатывания, прохождения желудка и всего пищеварительного тракта, сопровождающего действием соляной кислоты, желчных кислот, обилием ферментов (амилаз, липаз, протеаз), их специально защищают. Таблетированные формы, например, покрывают кислотоустойчивыми оболочками (ацетилфталатцеллюлоза, ойдрагит Е100), а сухие порошки помещают в кишечнорастворимые твердые капсулы на основе желатина или целлюлозы. Если и этого недостаточно, клетки заключают в гранулы на основе альгината, хитозана и других подходящих полимеров [Капсулированные в альгинат ... , 2022; Разработка способа ... , 2023]. Все эти приемы необходимы для того, чтобы в

нижние отделы кишечника и толстую кишку, где плотность индигенной микрофлоры достигает 10^{12} КОЕ/мл, попало достаточное количество живых бактерий пробиотиков. Лишь в этом случае поступившие в кишечник пробиотики способны восстанавливать нарушения целостности микробиома через адгезию на кишечном эпителии и последующую их колонизацию путем размножения и конкуренцию за пищевые ресурсы. В этом процессе молочнокислые бактерии активно используют такие антимикробные метаболиты как короткоцепочечные жирные кислоты, перекись водорода, альдегиды и бактериоцины.

Таким образом, осуществление активной колонизационной деятельности является одним из ключевых факторов поддерживающей пробиотикотерапии микробиома. Она реализуется с применением препаративных форм, обеспечивающих максимальную защиту живых клеток от разрушающего действия на них пищеварительных соков и целевую доставку. Понимание и реализация этих факторов в практике создания новых защищенных форм пробиотиков будет способствовать достижению еще большей их пользы для нашего здоровья.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Литература

Капсулированные в альгинат пробиотики: получение и некоторые свойства / А. Н. Сомов, В. Д. Похиленко, И. А. Дунайцев [и др.] // Биотехнология. 2022. Т. 38, № 5. С. 44–52. DOI: 10.56304/S0234275822050131

Разработка способа капсулирования симбиотических бактерий / В. Д. Похиленко, И. А. Дунайцев, Т. А. Калмангаев, [и др.] // Бактериология. 2023. Т. 8, № 3. С. 16–25. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-3-16-25

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ГОСТАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ ЛЕПТОСПИР РАЗЛИЧНЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП И РАЗЛИЧИЯМИ В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ЛЕПТОСПИРОЗОВ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ СССР/РОССИИ В ОТДЕЛЬНЫЕ ВРЕМЕННЫЕ ОТРЕЗКИ С 1962 ПО 2022 Г.

А. П. Самсонова

НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России
Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России
Москва, lepto@gamaleya.org

Лептоспирозы в настоящее время являются одними из самых распространенных в мире природно-очаговых зоонозов [Ананьина, 2019]. Широкое распространение природных и антропоургических очагов этой инфекции связывают с достаточно обширным спектром резервуарных хозяев патогенных лептоспир и восприимчивых к ним видов животных [Леп-

тоспирозы людей ... , 1971; Чернуха, Ананьина, 1991]. Более ста видов диких и домашних животных могут быть резервуарами (носителями) патогенных лептоспир: в природе среди диких млекопитающих –грызуны и насекомоядные, в хозяйственных (антропургических) очагах –домашние животные (собаки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, реже- козы и лошади). Непрерывность процесса циркуляции патогенных лептоспир в природе обеспечивается их способностью к колонизации эпителия извитых канальцев коркового слоя почек теплокровных хозяев, у которых формируется хроническое, часто пожизненное лептоспиросительство. Возбудители отдельных серогрупп и сероваров могут персистировать в слизистой оболочке генитального тракта и тканях центральной нервной системы животных-хозяев. Известно, что патогенным лептоспирам свойственна гостальная (хозяйинная) специфичность. Они циркулируют преимущественно в популяциях одного или ограниченного круга видов животных, являющихся основными резервуарами инфекции, что может быть обусловлено развитием адаптации микроорганизм-теплокровный хозяин в процессе эволюции [Чернуха, Ананьина, 1991].

Лептоспиры представляют собой гетерогенную группу возбудителей, у которых вклад представителей различных таксономических групп, в частности, сероваров и серогрупп, в этиологическую структуру заболеваемости людей и животных лептоспирозами может различаться. Известно, что этиологическая структура лептоспирозов непрерывно изменяется во времени и пространстве, но механизмы этих изменений не всегда понятны, а их изучение позволит получить данные, важные для разработки новых подходов к мониторингу, прогнозированию, диагностике и профилактике лептоспирозов. Поэтому целью данной работы является изучение вклада представителей различных серогрупп лептоспир в этиологическую структуру заболеваемости лептоспирозами на территории СССР/России в период 1962–2022 гг.

Были проанализированы архивные записи в журналах лаборатории лептоспирозов о результатах исследования в реакции микроагглютинации (РМА) сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами. Были исследованы образцы от 4773 больных. РМА проводили согласно методическим указаниям, последняя версия [МУ 3.1.1128, 2002]. Результаты исследования полового и возрастного составов больных, а также их серопревалентности были описаны нами ранее [Анализ документовированных ... , 2022].

Показано, что доминирующими возбудителями суммарно за весь исследуемый период (1962–2022 гг.) являются лептоспиры серогруппы *Grippityphosa* (23,86 % случаев). Представители этой серогруппы доминировали также на протяжении периодов 1970–1984 и 2000–2009 гг. Долголетнее доминирование в этиологической структуре заболеваемости лептоспирозами возбудителей серогруппы *Grippityphosa* можно объяснить, с одной стороны, наличием достаточно широкого круга животных-хозяев, а

с другой – устойчивостью их к неблагоприятным воздействиям окружающей среды вплоть до возможности перезимовывать в воде открытых водоемов в межсезонный период [Чернуха, Ананьина, 1991].

Представительство лептоспир серогруппы *Sejroe* в общем пуле составляет 16,42 % (второе место после *Grippythosa*). Рост вклада лептоспир этой серогруппы в заболеваемость можно отметить еще с конца 80-х годов, а их доминирование в настоящее время является мировым трендом [Тренды современного лептоспироза, 2018, Ананьина, 2019]. Большинство авторов связывают это с двумя факторами. Первым является более интенсивный, чем в предыдущие годы, рост численности и изменение ареалов грызунов – хозяев возбудителей природно-очаговых инфекций в условиях воздействия на природные очаги интенсивной хозяйственной деятельности людей и изменений климатических условий, прежде всего повышения среднегодовой температуры приземного слоя атмосферы. Вторым фактором в условиях глобализации экономики является повышение интенсивности трансграничного перемещения большого количества скота [Ананьина, 2019] при отсутствии карантинного досмотра на границах, что повышает риск заноса возбудителей на новые территории.

Следует отметить значительный вклад в этиологическую структуру заболеваемости лептоспирозами представителей серогруппы *Icterohaemorrhagiae* (11,71 % в общем пуле, третье место). В 1985–1989 гг. лептоспиры этой серогруппы, хоть и с незначительным превышением (22,38 %) над серогруппой *Grippythosa* (19,13 %), занимали первое место. Как отмечалось выше, основными хозяевами лептоспир этой серогруппы являются серые и черные крысы. Возбудители этой серогруппы (наряду с лептоспирами серогруппы *Canicola*) с наиболее высокой частотой среди других возбудителей лептоспирозов вызывают у людей тяжелые случаи заболевания с летальными исходами [Тренды современного лептоспироза, 2018, Ананьина, 2019]. В 80–90-х гг. XX в. отмечалась тенденция к переходу этих возбудителей на новых хозяев (крупный рогатый скот), что приводило к изменению характера заболевания: вместо спорадических случаев наблюдались «купальные» вспышки, происходил сдвиг к более легкому течению заболевания.

В 60-е гг. XX в. среди образцов сывороток крови, поступивших в нашу лабораторию, большинство были взяты от людей, занятых в животноводстве. Этим, по-видимому, и объясняется доминирование (29,7 %) лептоспир серогруппы *Romana*.

Представительство лептоспир серогруппы *Canicola* в общем пуле составляет 3,61 %. Следует отметить значительный рост вклада этих лептоспир в этиологическую структуру заболеваемости в период 1990–1994 гг. (25,64 %), они уступали только лептоспирам серогруппы *Sejroe* (35,90 %). Резкое повышение процента больных, у которых обнаружены антитела против лептоспир серогруппы *Canicola* в период 1990–1994 гг., совпадает с ростом числа случаев лептоспироза этой этиологии в указанные годы,

прежде всего в крупных городах (Москва, Санкт-Петербург) [Клинико-эпидемиологические особенности ... , 2007]. Многие авторы связывают это с ростом числа бродячих собак – основных хозяев лептоспир этой серогруппы в городах.

Таким образом, нами показано, что в отдельные временные периоды происходит изменение вклада лептоспир разных серогрупп, обладающих гостальной специфичностью в отношении животных-хозяев, в этиологическую структуру заболеваемости людей лептоспирозами.

Литература

Анализ документированных результатов исследования сывороток крови больных, подозрительных на заболевание лептоспирозами, в реакции микроагглютинации / А. П. Самсонова, Е. М. Петров, О. В. Савельева [и др.] // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 5. С. 875–890.

Ананьина Ю. В. 7.6. Лептоспирозы // Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. М. : МИА, 2019. Т. 2. С. 104–115.

Клинико-эпидемиологические особенности лептоспирозной инфекции в Санкт-Петербурге / С. О. Майорова, Н. А. Стоянова, Н. К. Токаревич, И. П. Федуняк // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007. Т. 12, № 1. С. 12–14.

Лептоспирозы людей и животных / под ред. В. В. Ананьина. М. : Медицина, 1971. 352 с.

Методические указания МУ 3.1.1128. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами. М. : Минздрав России, 2002. 44 с.

Тренды современного лептоспироза / В. Н. Городин, Д. Л. Мойсова, В. А. Бахтина, С. В. Зотов // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018. Т. 23, № 2. С. 93–100.

Чернуха Ю. Г., Ананьина Ю. В. Специфичность взаимоотношения паразит-хозяин в природно-очаговых системах // Проблемы инфектологии. 1991. С. 330–335.

Секция 4.3 БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КАК ОДНА ИЗ ФОРМ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

ИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Л. В. Волкова¹, И. С. Безматерных¹, А. Г. Волков¹, Л. И. Кононова²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет
Пермь, wolkowalw@mail.ru

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

Первые сообщения о роли бактериальных биопленок появились более 35 лет назад. На сегодняшний день биопленки описаны для 65 % возбудителей инфекционных заболеваний, изучены процессы формирования и жизнедеятельности биопленок, как на биологических, так и на абиотических поверхностях [Сычев, 2013].

Научным сообществом продолжают исследования по поиску новых эффективных средств, которые снизили бы агрессивный потенциал микробных биопленок и, как следствие, риск инфекционных заболеваний [Голуб, 2012; Состояние и тенденции ... , 2015].

Относительно недавно был получен белково-пептидный комплекс из донорских лейкоцитов (ЛПК) посредством их ультразвуковой дезинтеграции [Пат. № 2737730]. Выявленные антибактериальные свойства ЛПК позволяют рассматривать его в качестве основы для антимикробных лекарственных средств. Нами получен первый положительный опыт оценки эффективности ЛПК на адгезию бактерий к полистиролу [Влияние лейкоцитарного ... , 2022].

Целью исследования явилось изучение влияния лейкоцитарного белково-пептидного комплекса на адгезию и пленкообразование бактерий на гидрофобных поверхностях.

Материалы и методы. Объектами исследования служили грамположительные бактерии *Staphylococcus cohnii* ВКМ В-3165 и *Listeria welshimeri* Bel-19.

Влияние ЛПК на адгезию бактерий к гидрофобной поверхности изучали с использованием полистироловых чашек Петри (диаметр 45 мм). Для этого в чашки вносили растворы ЛПК в объеме 2 мл, в качестве контролей использовали растворы NaCl с концентрацией, соответствующей

таковой приготовленных разведений ЛПК. Чашки с растворами выдерживали 1 ч при температуре 20–22 °С. После удаления жидкости поверхности промывали фосфатным буфером (10 мМ, pH 7,2), подсушивали и вносили 2 мл бактериальных суспензий с содержанием в них 10^7 КОЕ/мл. Культуры инкубировали без перемешивания в течение 30 мин при 37 °С. Затем планктонные клетки удаляли аспирацией, дно чашек промывали фосфатным буфером, высушивали и окрашивали 0,1 % генцианвиолетом в течение 2 мин, отмывали от красителя водой, высушивали и определяли численность адгезированных клеток на микровизоре μ Vizo-103 («Ломо», Россия), просматривая в двадцати полях зрения при увеличении $\times 1000$.

Изучение влияния ЛПК на пленкообразование бактерий проводили в плоскодонных 96-луночных полистироловых планшетах («Медполимер», Россия) в питательной среде LB (г/л: триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5) с добавлением глюкозы до 0,25 % и ЛПК до концентрации 0,5 и 1 мг/мл. Бактериальные инокуляты вносили в лунки планшетов до 10^6 КОЕ/мл и инкубировали при 37 °С в статических условиях в течение 24 ч. По истечению срока инкубации планктонные клетки удаляли, два раза промывали 0,95 % раствором NaCl, подсушивали и окрашивали 0,1 % раствором генцианвиолета в течение 20 мин. После окрашивания генцианвиолет удаляли, лунки промывали два раза водой, высушивали и вносили по 150 мкл 95 % этанола. Биомассу образованных био пленок определяли путем измерения оптической плотности спиртовых экстрактов связанного генцианвиолета на микропланшетном спектрофотометре Benchmark Plus (BioRad, США) при длине волны 570 нм. В качестве положительных контролей служили био пленки без ЛПК. Отрицательным контролем являлась стерильная питательная среда без ЛПК.

Результаты и обсуждение. Сравнение адгезионных способностей исследуемых бактерий показало, что предобработка полистирола лейкоцитарным препаратом в концентрации 10 мг/мл снижала степень адгезии к нему бактерий обоих родов. Однако на адгезию бактерий *S. cohnii* влияние препарата было выражено в большей степени, так как происходило снижение сорбции бактериальных клеток более чем на 50 % по сравнению с контролем (рис. 1). В то время как на листерий – на 22 % от контролей (рис. 2). Было установлено, что предобработка полистирола раствором ЛПК в концентрации 20 мг/мл снижала сорбцию исследуемых бактерий в одинаковой степени – более чем на 70 % от контролей (рис. 1, 2).

В то же время было обнаружено, что ЛПК в использованных количествах (0,5 и 1 мг/мл) не оказывал достоверного ингибирующего действия на процесс формирования пленок обоих бактериальных штаммов.

Таким образом, лейкоцитарный белково-пептидный комплекс обладал выраженным антиадгезивным потенциалом против изученных видов бактерий.

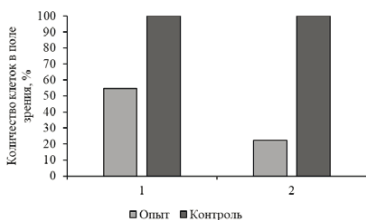


Рис. 1. Адгезия бактерий *S. cohnii* на поверхности полистирола в присутствии ЛПК:

1 – 10 мг/мл; 2 – 20 мг/мл.

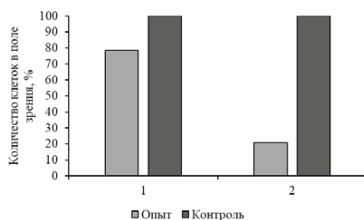


Рис. 2. Адгезия бактерий *L. welshimeri* на поверхности полистирола в присутствии ЛПК:

1 – 10 мг/мл; 2 – 20 мг/мл.

Литература

Влияние лейкоцитарного белково-пептидного комплекса на адгезию бактерий к полистеролу / И. С. Безматерных, Л. И. Кононова, В. П. Коробов, Л. В. Волкова // Химия. Экология. Урбанистика : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с Междунар. участием. В 4 т. Т. 2. 2022. С. 27–31.

Голуб А. В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. Т. 14, № 1. С. 23–29.

Пат. № 2737730 Рос. Федерация. Способ фракционирования лейкоцитарных белков : № 2019114590 : заявл. 13.05.2019; опубл. 13.11.2020 / Л. В. Волкова, Т. А. Гришина, А. Г. Волков, Бюл. № 32.

Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения / И. А. Дятлов, А. Ю. Миронов, А. П. Шепелин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 8. С. 61–65.

Сычев Д. А. Роль биопленок в патогенезе тяжелых инфекционных осложнений и современные возможности терапии // Consilium MEDICUM. 2013. Т. 15, № 11. С. 75–78.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИХ ОБНАРУЖЕНИЯ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ

С. С. Евстигнеева, Д. С. Чумаков, О. И. Гулий

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение ФИЦ «Саратовский научный центр РАН гСаратов, Stels20295@yandex.ru

В природной среде обитания подавляющее большинство микроорганизмов образуют биопленки, которые представляют собой сформированный на границе раздела фаз мультислой клеток, погруженных в экстраклеточный биополимерный матрикс. Бактерии организуют биопленочные сообщества для повышения выживаемости при адаптации к негативным воздействиям среды [Microbial biofilms, 1995]. Изучение биопленок имеет огромное практическое значение для различных сфер деятельности. С одной стороны, биопленки участвуют в производстве продуктов питания и напитков, задействованы в очистке почв и сточных вод, защищают расте-

ния от фитопатогенной микрофлоры [Biofilm – a syntrophic ... , 2023]. Однако, с другой стороны, подавляющее число возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных образуют биопленки, тем самым сильно усложняя антимикробную терапию [Microbial biofilm ... , 2023]. В настоящее время существует проблема, связанная с недостатком методик своевременной и эффективной детекции биопленок, независимо от их локализации и природы субстрата.

Цель настоящего исследования состояла в разработке новых методов обнаружения бактериальных биопленок на разнообразных поверхностях с использованием различных биофизических принципов.

На основе регистрации изменения поляризуемости бактериальных клеток под действием переменного электрического поля в режиме реального времени была создана микрофлюидная биоаналитическая сенсорная система для индикации образования биопленок. Была описана физическая картина изменения сенсорного сигнала при переходе клеток от свободноживущего или планктонного состояния к биопленочному [Guliy, Evstigneeva, Bunin, 2022a]. Также был разработан электрооптический сенсорный метод экспресс-диагностики начальной фазы формирования бактериальных биопленок *in vitro*, который позволяет зафиксировать первые этапы объединения клеток в конгломераты, а далее в полноценное сообщество. Такой метод определяет разницу электрофизических профилей планктонных и биопленочных клеток за счет конформационных изменений компонентов внешней мембраны, в том числе, молекул липополисахаридов [Guliy, Evstigneeva, Bunin, 2022b]. При использовании данных сенсорных систем время анализа образцов не превышает 30 мин, кроме того, для мониторинга роста биопленок не требуется дополнительных пробоподготовок и специальных красителей. Микрофлюидный и электрооптический сенсоры позволяют осуществлять быстрое обнаружение биопленок в жидких пробах, в том числе на ранних стадиях их формирования, без предварительного микроскопирования образца [Guliy, Evstigneeva, Bunin, 2022a,b]. Данные методы могут успешно применяться в медицинской диагностике для детекции биопленок в биоптатах, например, в соникационных жидкостях, полученных с эндопротезов после ультразвуковой обработки, а также при экологически ориентированном сельском хозяйстве для анализа ризосферного микробиома.

Впервые была разработана технология универсального окрашивания и качественной/количественной детекции биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий с помощью флуоресцентных золотых нанокластеров [Detection and imaging ... , 2023]. Данные наноструктуры отличаются высокой фотостабильностью, широким Стоксовым сдвигом, исключительной простотой синтеза, высокой биосовместимостью и возможностью спектральной настройки эмиссии флуоресценции. Нами были синтезированы золотые нанокластеры на основе различных органических молекул и проведен скрининг их способности взаимодействовать с мат-

риксом биопленок. Было показано, что стабилизированные остатками глутатиона нанокластеры (GSH-AuNCs) способны без узнающих молекул связываться с компонентами экстраклеточного матрикса, в частности, с амилоидными белками и полисахаридами. Описанное нами явление нашло практическое приложение в создании технологии для экспресс-детекции биопленок на различных поверхностях, включая покровные стекла, пробирки и урологические катетеры. Разработанный нами метод оказался в 10 раз чувствительнее стандартного метода детекции биопленок на основе красителя кристаллического фиолетового, а также отличается простотой исполнения и лучшей воспроизводимостью [Detection and imaging ... , 2023]. В отличие от электрооптических систем детекции, метод на основе флуоресцентных нанокластеров можно применять для обнаружения биопленок не только в смывах и биоптатах, но и непосредственно на поверхности медицинских устройств *in situ* включая катетеры, эндотрахеальные трубки, билиарные стенты. В целом, флуоресцентный метод детекции биопленочных сообществ может найти широкое применение в клинической микробиологии, позволяя диагностировать опасные для жизни людей патогены, а также может стать эффективной заменой метода на основе кристаллического фиолетового при выполнении микробиологических тестов любой направленности.

Разработанные сенсорные системы будут иметь важное фундаментальное значение для выяснения ключевых механизмов биопленкообразования у разных типов бактерий. Помимо этого, данные сенсоры смогут внести вклад в создание полноценной комбинированной диагностической системы для распознавания биопленок в клинической практике и подбора оптимальной антимикробной терапии для борьбы со смертельно опасными инфекционными заболеваниями.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00246, <https://rscf.ru/project/23-24-00246/>.

Литература

- Biofilm – a syntrophic consortia of microbial cells: boon or bane? / S. Mukherjee, S. Bhattacharjee, S. Paul [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. 2023. Vol. 195. P. 5583–5604.
- Detection and imaging of bacterial biofilms with glutathione-stabilized gold nanoclusters / S. S. Evstigneeva, D. S. Chumakov, R. S. Tumskiy [et al.] // Talanta. 2023. Vol. 264. Art. 124773.
- Guliy O. I., Evstigneeva S. S., Bunin V. D. Microfluidic bioanalytical system for biofilm formation indication // Talanta. 2022a. Vol. 247. Art. 123541.
- Guliy O. I., Evstigneeva S. S., Bunin V. D. Electrical sensor system for *in vitro* bacteria biofilm diagnostics // Biosensors and Bioelectronics: X. 2022b. Vol. 11. Art. 100174.
- Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment / S. Sharma, J. Mohler, S. D. Mahajan [et al.] // Microorganisms. 2023. Vol. 11. Art. 1614.
- Microbial biofilms / J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell [et al.] // Annual Review in Microbiology. 1995. Vol. 49. P. 711–745.

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО И АНТИБИОПЛЕНОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

М. В. Каракозова¹, П. А. Назаров²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, mvk752002@gmail.com

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Москва, nazarovpa@gmail.com

Поиск новых антибиотиков является насущной проблемой современного здравоохранения во всем мире. Быстрое распространение резистентности снижает вероятность того, что инвестиции фармкомпаний в разработку новых антибиотиков окупятся, таким образом быстрый и своевременный анализ перспективности получаемых веществ как антибактериальных агентов необходим для современной отрасли разработки антибактериальных препаратов.

Новые подходы к поиску антибактериальных препаратов среди веществ растительного происхождения требуют высокопроизводительного анализа получаемых веществ, так как лишь небольшая часть из этих соединений прошла тщательное исследование их механизмов действия на бактериальные клетки.

В нашей работе [Antimicrobial and Cytotoxic ... , 2023] мы проанализировали вещество, полученное из эндофитных грибов, сосуществующих с растением иссоп лекарственный. Нашими коллегами из Узбекистана был выделен штамм гриба *Chaetomium elatum* и из него получено антибактериальное вещество – пеницилловая кислота. Нашей группой был осуществлён анализ антибактериального действия пеницилловой кислоты. Пенициллиновая кислота продемонстрировала сильную антибактериальную активность против *Bacillus. subtilis* и *Staphylococcus aureus*.

В силу того, что помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) могут принимать участие в откачке антибактериальных препаратов, что может дать терапевтическое окно в два порядка величин минимальной ингибирующей концентрации, мы проанализировали пеницилловую кислоту на способность распознаваться и откачиваться 8 помпами МЛУ *Escherichia coli*, включая главную помпу МЛУ *E. coli* – AcrAB-TolC.

Наличие антибактериальной активности не всегда означает наличие антибиопленочной активности. Так, например, антибиотик хлорамфеникол в сублетальных концентрациях вызывает индукцию биопленкообразования [Conjugates of Chloramphenicol ... , 2022], что ограничивает его применение из-за возможности хронизации инфекционного процесса при лечении с помощью хлорамфеникола (рис.). Поэтому мы применили апробированный нами метод анализа биопленок и установили, что пеницилловая кислота обладает как антибактериальным, так и антибиопленочным действием.

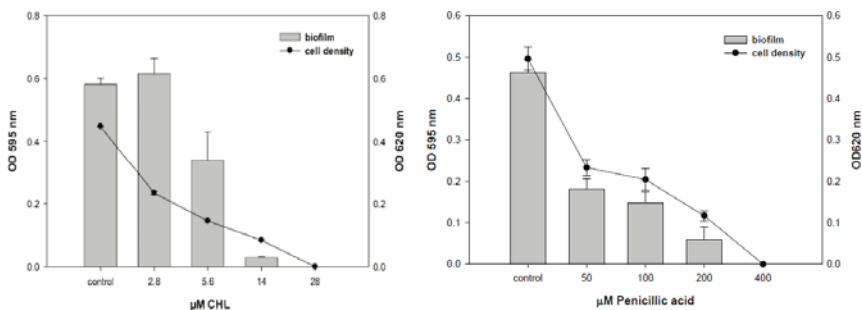


Рис. Формирование биопленок под действием хлорамфеникола (слева) и пеницилловой кислоты (справа) [Antimicrobial and Cytotoxic ... , 2023; Conjugates of Chloramphenicol ... , 2022]

Таким образом, нами был разработан комплексный подход к анализу действия веществ растительного происхождения, и он был применен на практике в отношении пеницилловой кислоты, полученной из эндофитных грибов.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-15-00099.

Литература

Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Isolated from the Medicinal Plant *Hyssopus officinalis* / F. Eshboev, M. Karakozova, J. Abdurakhmanov [et al.] // Antibiotics (Basel). 2023. Vol. 12, N 7. Art. 1201.

Conjugates of Chloramphenicol Amine and Berberine as Antimicrobial Agents / J. A. Pavlova, A. G. Tereshchenkov, P. A. Nazarov [et al.] // Antibiotics (Basel). 2022. Vol. 12, N 1. Art. 15.

ОСОБЕННОСТИ ВОСПРИИМЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ В СМЕШАННЫХ СООБЩЕСТВАХ

А. Р. Каюмов

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

Подавляющее большинство инфекционных заболеваний человека и животных так или иначе связано с образованием биопленок – микробных консорциумов, погруженных в выделяемый ими высокомолекулярный матрикс, состоящий из белков, нуклеотидов и полисахаридов. В составе биопленки микроорганизмы защищены от иммунной системы хозяина и характеризуются толерантностью к противомикробным препаратам благодаря матриксу биопленки. Несмотря на то что к настоящему времени предложено множество препаратов и стратегий для эрадикации биоплен-

ки, продемонстрированная в лаборатории эффективность, не всегда гарантирует успешное лечение в клинических условиях.

В докладе приводятся данные по изменению структуры, состава матрикса двухвидовых биопленок и их проницаемости для антибиотиков. Обсуждаются механизмы этих изменений на основе данных транскриптомного анализа и количественной ОТ-ПЦР-РВ. По данным микроскопии двухвидовые биопленки *S. aureus*-*E. coli* и *S. aureus*-*K. pneumoniae* становятся более пористыми и *S. aureus* расположен в нижних слоях биопленок. Биопленка *S. aureus*-*P. aeruginosa* наоборот становится более плотной с перемещением стафилококка в верхние слои. В биопленке *S. aureus*-*K. pneumoniae* увеличивается содержание бета-полисахаридов и снижается количество белков. В матриксе биопленки *S. aureus*-*P. aeruginosa* снижаются альфа-полисахариды и белки. Кроме того, в биопленках *S. aureus* с *P. aeruginosa* или *K. pneumoniae* подавляется транскрипция *ica*-оперона *S. aureus* и повышается транскрипция генов полисахаридов в *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. В двухвидовых биопленках повышается проницаемость матрикса для фторхинолонов. Данный эффект сохраняется при внесении культуральной жидкости *S. aureus* к биопленкам *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и повышает чувствительность бактерий к антибиотикам.

Знание эффективности различных групп антибиотиков для терапии различных смешанных инфекций, закономерности взаимодействия между различными видами бактерий в составе смешанных биопленок, в том числе молекулярные механизмы данных взаимодействий, определяющие в том числе изменение эффективности антимикробных препаратов при терапии смешанных инфекций, позволит скорректировать рекомендации по рациональному использованию различных групп антимикробных препаратов в зависимости от микробного состава инфекции и повысить эффективность ее терапии.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-00194, <https://rscf.ru/project/24-14-00194>

БИОПЛЕНКИ *MYCOLICIBACTERIUM SMEGMATIS* НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИСТИРОЛА И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПЕПТИДАМ

А. Н. Лобанов¹, Т. В. Полудова²

¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
Пермь, lobdn26@mail.ru

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
Пермь, polyudova@iegm.ru

Устойчивость микобактерий к антибиотикам обусловлена химической природой липидов во внешнем слое клеточной стенки. Матрикс биопленок микобактерий также содержит гликопептидолипиды, короткоцепочечные миколовые кислоты и другие соединения, позволяющие формировать их сложную архитектуру [Muñoz-Egea, Akir, Esteban, 2023]. Эффективность этого барьера можно изменить с помощью ингибиторов биосинтеза основных компонентов, одним из которых является полипептидный антибиотик бацитрацин, увеличивающий проницаемость клеточной стенки [Activities of fluoroquinolone ... , 1993]. Пептидные антибиотики полимиксинового ряда также обладают активностью в отношении микобактерий, действуя на цитоплазматическую мембрану и вызывая утечку содержимого клеток [Koen, Van Breda, Loots, 2018].

Целью настоящей работы было изучение антибактериального действия пептидных антибиотиков бацитрацина, полимиксина Б и колистина (полимиксин Е) в отношении планктонных бактерий и биопленок *Mycobacterium smegmatis* mc²155.

В работе использованы пептидные антибиотики полимиксин Б сульфат, колистин сульфат и бацитрацин (Sigma, США) Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли методом двукратных разведений, как описано ранее [Suppression of planktonic ... , 2024]. Биопленки выращивали в течение трёх суток на поверхности полистирола (96 луночные плоскодонные планшеты (Медполимер, Россия)) в среде М63, однократно промывали, а лунки заполняли стерильной питательной средой с разными концентрациями антибиотиков. Выдерживали 24 ч, удаляли жидкость и окрашивали 2 ч раствором (0,05 мкг/мл) thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma, США). Формазан экстрагировали лизирующим раствором, интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре (Benchmark Plus, BioRad, США) [Polyudova, 2024]. Действие комбинаций антибиотиков оценивали методом «шахматная доска» в бульоне Мюллера-Хинтона на планктонных клетках и биопленках, вычисляя фракционные ингибирующие концентрации и их индексы (ИФИК) [Synergy tests by ... , 2005]. Оценку синергизма проводили в программе SynergyFinder Plus [Janevski, Giri, Aittokallio, 2020].

В результате исследований установлены МИК пептидных антибиотиков для планктонных клеток *M. smegmatis* mc²155, составляющие 100 мкг/мл для бацитрацина и 3,13 мкг/мл для каждого из полимиксинов. Подавления бактерий бацитрацином в составе зрелых биопленок не наблюдалось при концентрации 1 мкг/мл, а минимальная ингибирующая концентрация обоих полимиксинов возрастала до 100 мкг/мл. Совместное использование бацитрацина с полимиксинами позволила существенно снизить концентрации антибиотиков в паре (табл.).

Таблица

Фракционные ингибирующие концентрации (мкг/мл) и индекс фракционной ингибирующей концентрации (ИФИК) комбинаций пептидных антибиотиков, действующих на планктонные клетки и биопленки *M. smegmatis* mc²155

	Планктонные клетки	ИФИК	Биопленки	ИФИК
Бацитрацин	12,5	0,36	250	0,63
Колистин	0,75		50	
Бацитрацин	25,0	0,73	125	0,56
Полимиксин Б	1,5		50	

Расчет ИФИК показал, что синергизм совместного действия проявлялся только для пары бацитрацин/колистин, действующей на планктонные клетки *M. smegmatis* mc²155 (ИФИК < 0,5). В остальных случаях наблюдалось аддитивное действие антибиотиков (0,5 < ИФИК < 1,0) (см. табл.). При изучении действия антибактериальных пептидов на зрелые биопленки было исследовано 20 комбинаций концентраций антибиотиков. Результаты теста были преобразованы в процент жизнеспособности бактерий, относительно контроля (без антибиотиков). Математический анализ проведен с применением модели HSA (Higher Single Activity model). Согласно данной модели показатель синергии менее –10 свидетельствует об антагонистическом взаимодействии двух соединений, от –10 до 10 – аддитивное действие, а более 10 – синергизм. В наших экспериментах выявлены синергидные сочетания пар антибиотиков. Так для пары бацитрацин/колистин показатель синергии равен 18, а для пары бацитрацина/полимиксин Б – 22 (рис.).

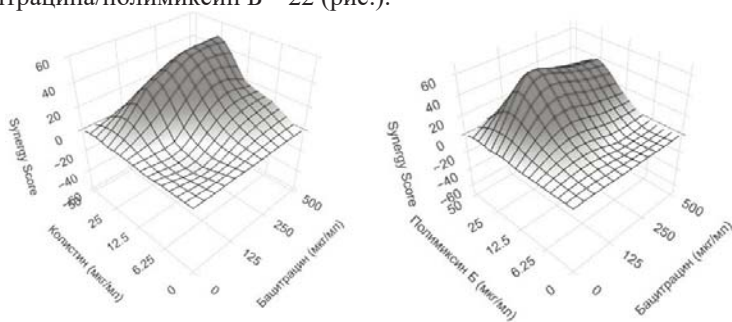


Рис. Трёхмерный график синергии антибактериального действия на биопленки *M. smegmatis* mc²155 бацитрацина с колистином (слева) и бацитрацина с полимиксином Б (справа). На оси Z указан показатель синергии (synergy score)

Таким образом, результаты исследования показали возможность совместного действия пептидных антибиотиков с целью подавления жизнеспособности *M. smegmatis* mc²155 не только планктонных форм, но и в составе зрелых биопленок.

Работа выполнена в рамках госзадания № 124020500028-4.

Литература

Activities of fluoroquinolone, macrolide, and aminoglycoside drugs combined with inhibitors of glycosylation and fatty acid and peptide biosynthesis against *Mycobacterium avium* / W. W. Barrow, E. L. Wright, K. S. Goh, N. Rastogi // Antimicrobial agents and chemotherapy. 1993. Vol. 37, N 4. P. 652–661.

Ianevski A., Giri A. K., Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies // Nucleic acids research. 2020. Vol. 48, N 1. P. 488–493.

Koen N., Van Breda S. V., Loots D. T. Elucidating the antimicrobial mechanisms of colistin sulfate on *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics // Tuberculosis. 2018. Vol. 111. P. 14–19.

Muñoz-Egea M. C., Akir A., Esteban J. *Mycobacterium* biofilms // Biofilm. 2023. Vol. 5. Art. 100107.

Suppression of planktonic and biofilm of *Escherichia coli* by the synergistic lantibiotics–polymyxins combinations / T. Polyudova, L. Lemkina, D. Eroshenko, A. Esaev // Archives of Microbiology. 2024. Vol. 206, N 4. Art. 191.

Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Bruccella melitensis* / G. Orhan, A. Bayram, Y. Zer, I. Balci [et al.] // Journal of clinical microbiology. 2005. Vol. 43, N 1. P. 140–143.

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ АДАПТАЦИОННЫЕ РЕАКЦИИ

Ю. Г. Максимова^{1,2}, Е. В. Пьянкова¹, А. Ю. Максимов

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал Пермского ПФИЦ УрО РАН, Пермь, yul_max@mail.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский, университет, Пермь

Биопленки – основная форма существования микроорганизмов, значительно отличающаяся от планктонной ростовыми характеристиками, экспрессией генов, повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды. Усиленное биопленкообразование может быть адаптационной реакцией на различные факторы внешней среды, и сам процесс может приносить либо вред (в случае микроорганизмов, вызывающих персистирующие инфекции, коррозию, колонизацию оборудования и т. д.), либо пользу, когда микробные биопленки осуществляют биотехнологически значимые процессы (биокатализ, брожение, биодеградацию, очистку сточных вод, электрогенез, биодетекцию). В связи с этим требуется разработка подходов к предотвращению формирования и элиминированию «вредных» микробных биопленок или, наоборот, к поддержанию «полезных».

В последнее время большое внимание уделяется наноразмерным материалам, в том числе углеродным нанотрубкам и графену, в связи с их уникальными механическими, химическими и физическими характеристиками. Данные о влиянии наноуглерода на микроорганизмы противоречивы: так, есть немало сведений об их антимикробных и антибиопленочных свойствах [Review on antimicrobial ... , 2023], однако сами углеродные наноматериалы не обеспечивают такой сильный антимикробный эффект, как, например, наночастицы благородных металлов. Наноматериалы могут проявлять свою антибиопленочную активность посредством множества механизмов: 1) прямого взаимодействия с клеткой (адсорбция, образование активных форм кислорода, взаимодействие с ДНК и/или белками); 2) ингибирования продукции внеклеточного матрикса, межклеточной коммуникации; 3) запуска иммунного ответа хозяина при колонизации макроорганизма [Maksimova, Zolina, 2024].

Целью работы явилось изучение влияния функционализированных углеродных нанотрубок (фУНТ) и производных графена на клетки и биопленки протеобактерий, имеющих биотехнологическое значение.

На примере протеобактерии *Alcaligenes faecalis* 2, выделенной нами ранее из активного ила [Бактерии активного ила ... , 2015], изучено воздействие УНТ и производных графена на биопленкообразование, метаболическую активность и морфометрические характеристики клеток биопленок. Биомассу биопленки оценивали по ОП₅₄₀ экстрагированного красителя кристаллического фиолетового (Реахим, Россия), метаболическую активность – по изменению ОП₅₇₀ при восстановлении соли тетразолия до окрашенного формазана (реактив МТТ, Servicebio, Китай), морфологию и морфометрические характеристики изучали с помощью АСМ Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США).

Установлено, что оксид графена (ГО) приводит в большинстве случаев к достоверному снижению биомассы биопленки *A. faecalis* 2 как при росте в присутствии наноматериалов, так и при 4-часовом воздействии на зрелую биопленку (рис. 1). Также достоверно снижается метаболическая активность клеток биопленок. Однако воздействие более гидрофобного восстановленного оксида графена (вГО) приводит к накоплению на 7-е сутки роста биомассы, превышающей контрольную биопленку в 2 раза. Метаболическая активность клеток биопленок снижается как на 3-е, так и на 7-е сут. роста при воздействии этих углеродных наноматериалов. При этом не происходит ни полного подавления метаболизма или ингибирования биопленкообразования, ни абсолютной эрадикации биопленок под воздействием производных графена.

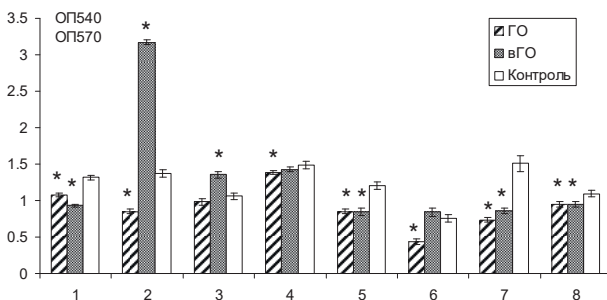


Рис. 1. Влияние производных графена на биоленкообразование *A. faecalis* 2. Биомасса 3 (1,3,5,7) и 7 (2,4,6,8) суточной биоленки на среде ВТН с УНМ (1,2,5,6) и после разрушения в 0,9 % NaCl с УНМ (3,4,7,8), окраска кристаллическим фиолетовым, ОП₅₄₀ (1–4), окраска реактивом МТТ, ОП₅₇₀ (5–8), * $p < 0,05$ ($n = 16$)

УНТ одностенные немодифицированные (ОУНТ) и функционализованные группами -COOH вызывали усиление биоленкообразования *A. faecalis* 2. Изучены морфометрические характеристики клеток биоленок, отмечено увеличение шероховатости поверхности клеток при воздействии ОУНТ и ОУНТ-COOH ($142,91 \pm 11,42$ и $149,15 \pm 5,44$ нм против $115,47 \pm 7,63$ нм в контроле). При этом клетки были покрыты агрегированным материалом, предположительно, экзополимером (рис. 2).

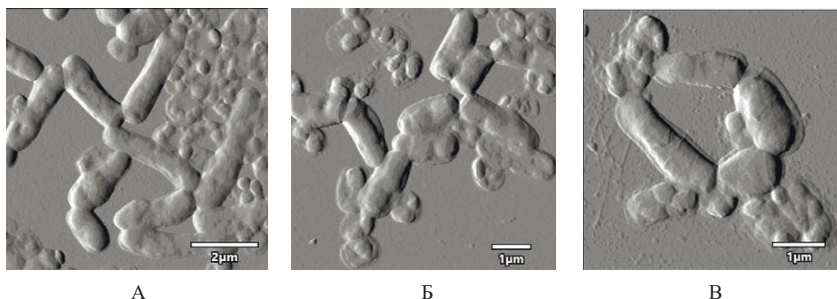


Рис. 2. Изменение морфологии клеток биоленок *A. faecalis* 2 под воздействием УНТ: А – контроль, Б – ОУНТ, В – ОУНТ-COOH.

Таким образом, не обнаружено сильного антибиоленочного действия производных графена, а ОУНТ и ОУНТ-COOH оказывали, наоборот, пробиоленочное действие на *A. faecalis* 2.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20008.

Литература

Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот / В. А. Демаков, Д. М. Васильев, Ю. Г. Максимова, [и др.] // Микробиология. 2015. Т. 84, № 3. С. 369–378.

Maksimova Yu. G., Zorina A. S. Antibiofilm and Probiofilm Effects of Nanomaterials on Microorganisms (Review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2024. Vol. 60, N 1. P. 1–16.

Review on antimicrobial mechanism and applications of graphene-based materials / K. Shankar, S. Agarwal, S. Mishra [et al.] // Biomat. Adv. 2023. Vol. 150. Art. 213440.

МОНОФТАЛАТЫ КАК ВЕРОЯТНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ КЛЕТОЧНОГО РОСТА И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *SERRATIA PROTEAMICULANS*

Л. А. Максимова, Т. Н. Шафикова, А. Г. Еникеев, А.А. Семёнов

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

Иркутск, VendyS@yandex.ru

Распространено мнение, что фталаты являются исключительно ксенобиотиками-поллютантами, а высокий уровень нахождения их в окружающей среде – следствие облегченной диффузии этих соединений из пластмассовых изделий. В настоящее время экспериментально доказана возможность биосинтеза эндогенных фталатов в организмах различных таксономических групп: растениях, грибах и микроорганизмах. Ранее нами было сделано предположение о биологической роли эндогенных фталатов растений как соединений вторичного метаболизма преимущественно с защитной функцией, участвующих в сети межвидовых взаимодействий между растениями, животными, грибами и микроорганизмами. Концепция биогенеза фталатов предполагает наличие определенных функций этих соединений в живых системах. На физиологическом уровне фталаты могут действовать как метаболический дизраптор, нарушающий координацию обменных процессов. Известен один из механизмов действия этих соединений – лиганд-рецепторный, что не исключает наличие и других молекулярных механизмов [Максимова, Шафикова, 2022].

Экспериментальные исследования физиологического воздействия фталатов ведутся с синтетическими аналогами, в связи с трудностью выделения нативных соединений. Между тем синтетические и эндогенные фталаты имеют существенные стереохимические различия, что может являться причиной разнонаправленности их воздействия на живые организмы. Биологическая роль природных фталатов остается неустановленной. Класс фталатов разнообразен по строению концевых радикалов, и по всей вероятности, именно они являются определяющей функциональной детерминантой. Сравнение физиологического эффекта фталатов разного строения является целью данной работы.

Исследования начались с изучения влияния синтетических аналогов монофтالات (мометилфталат (МНФ); моноонилфталат (МОНФ) и моноэтилгексилфталат (МЭГФ)) на рост и биофленкообразование у бактерии *Serratia proteamaculans* (штамм любезно предоставлен Ю. В. Зайцевой из Ярославского государственного университета им. П. Г. Демидова). *S. proteamaculans* хорошо изучена на молекулярно-генетическом уровне и является удобным модельным объектом для изучения растительно-микробных взаимодействий на различных уровнях организации.

Потомство одной бактерии – одна колонеобразующая единица – ресуспендировалась в 3 мл жидкой питательной среды 1/4 YPD и выращивалась сутки при постоянном перемешивании в темноте при 25 °С. Далее эта исходная суспензия разводилась до 80 мл 1/10 YPD и разделялась на варианты по 20 мл. Монофтالات добавлялись в концентрации 20мкМ в конечном объеме. Каждый вариант раскапывался в отдельный 96-луночный отдельный планшет, которые помещались в термостат при 28 °С. Через 7 сут. совместного культивирования с фталатами измерялась оптическая плотность, по которой судили о росте бактериальной культуры и плотности биофленок.

Выявлено, что в присутствие в среде исследуемых монофтالات рост бактериальной суспензии усиливается (рис.).

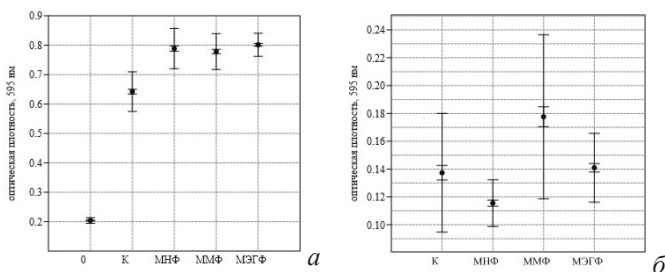


Рис. Рост (а) и биофленкообразование (б) *S. proteamaculans* в присутствии монофтالات. Данные представлены в виде $M \pm \delta$, $n = 65,0$ – исходная суспензия

На процесс биофленкообразования действие исследуемых монофтатов различно: как нейтральное (МЭГФ), умеренно выраженное подавление формирования биофленок (МНФ), так и стимуляция (ММФ).

Известно, что микроорганизмы могут использовать фталаты как органический субстрат, однако соотношение используемой в данной работе концентрации действующего вещества и объема среды пренебрежимо мало. Поэтому наблюдаемый эффект монофтатов на рост и биофленкообразование бактерий свидетельствует в пользу их действия на регуляторном уровне.

В работе Dominelli показано, что фенотипическая гетерогенность *Photorhabdus luminescens* является результатом эпигенетических преобразований. Хотя механизм фенотипического переключения остается пока неизвестным, есть сведения, что немаловажную роль в этом событии играют транскрипционные регуляторы [High-throughput sequencing ... , 2022]. Планктонная фаза и биопленки также являются дискретными фенотипическими формами существования микроорганизмов. Мы предполагаем наличие аналогичного «переключателя» (phenotypic switching) и для фаз планктон/биопленка, не исключая иные формы регуляции. Возможно, что фталаты (а также другие соединения класса QS) являются индукторами фенотипического переключения.

Работа выполнена в рамках проекта под номером государственной регистрации – 122041100050-6.

Литература

Максимова Л. А., Шафикова Т. Н. Эндогенные фталаты как вероятный регулятор межвидовых взаимоотношений в биоценозе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2022. Т. 12, № 3. С.424–437. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-424-437>.

High-throughput sequencing analysis reveals genomic similarity in phenotypic heterogeneous *Photorhabdus luminescens* cell populations / N. Dominelli, H. Y. Jäger, A. Langer, A. Brachmann, R. Heermann // Ann Microbiol. 2022. Vol. 72. <https://doi.org/10.1186/s13213-022-01677-5>

ВЛИЯНИЕ ТОБРАМИЦИНА НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

У. М. Немченко, Н. Л. Белькова, Р. Е. Зугеева, Е. Д. Савилов

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека
Институт эпидемиологии и микробиологии
Иркутск, umnemch@mail.ru

Муковисцидоз (МВ) относится к ауtosомно-рецессивным наследственным заболеваниям, с многообразными клиническими проявлениями, ведущую роль в которых играет нарушение секреторной функции всех экзокринных желез, приводящее в большинстве случаев, к поражению легких. Неизменной компонентой, определяющей прогрессирование болезни, является хроническая колонизация дыхательных путей при МВ *Pseudomonas aeruginosa* [Переновска, Стоянова, Стратева, 2015]. Способность к образованию биопленки поддерживает персистенцию *P. aeruginosa*, и может способствовать патогенезу легочных обострений. В связи с этим нарушение проникновения противомикробных препаратов через бактериальную биопленку считается одной из важнейших причин неуспеха противосинежной терапии при МВ [Parkins, Somayaji, Waters, 2018; Taccetti, 2021].

Важным элементом терапии муковисцидоза в последнее десятилетие стало ингаляционное применение антибиотиков. Одним из наиболее широко применяемых препаратов, обладающим минимальными побочными эффектами, является аминогликозидный антибиотик тобрамицин [Переновска, 2015].

Цель работы: исследовать *in vitro* активность тобрамицина в отношении биопленок штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от больных МВ.

Материалы и методы. Объектом исследования стали девять клинических штаммов *P. aeruginosa* из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии ИЭМ НЦ ПЗСРЧ, выделенных от пяти пациентов с МВ. Способность к биопленкообразованию (БП), определение МПК тобрамицина в отношении планктонных клеток оценивали по методикам, описанным ранее [Тапальский, 2018; Немченко, 2022]. Влияние тобрамицина (Tobramycin, Sigma-Aldrich) на биопленки оценивали путем внесения раствора антибиотика (50 мкл), приготовленного по стандартной методике (ГОСТ Р ИСО 20776–1-2010) в лунки 96-ти луночного стерильного плоскостонного иммунологического планшета. Предварительно лунки были инокулированы суспензией микроорганизмов (150 мкл бактериальной взвеси, $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл). Способность тобрамицина воздействовать на биопленочную активность оценивали на начальном этапе адгезии клеток к пластику и на суточную биопленку. Коэффициент влияния тобрамицина рассчитывали по формуле: $ОП\ БП_{опыт} / ОП\ БП_{без\ АМП}$, где ОП БП_{опыт} – оптическая плотность этанольного экстракта биопленки, подвергшейся влиянию тобрамицина, ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность этанольного экстракта биопленок культур не подвергавшимся влиянию антибиотика. При коэффициенте < 0,9 считали, что АМП влияет на биопленку; от 0,9 до 1,0 – АМП слабо влияет на биопленку; от 1,0 и выше – АМП не влияет на биопленку [Влияние антимикробных ... , 2022].

Результаты. Способностью к биоплёнкообразованию обладали все исследуемые штаммы, при этом семь изолятов формировали умеренно выраженные БП, два изолята обладали слабой способностью образовывать БП.

В эксперимент по воздействию тобрамицина на формирование БП были взяты рабочие растворы тобрамицина в концентрациях 2,0 мгк/мл, 0,25 мгк/мл, 0,12 мгк/мл, входящие в диапазон целевых и допустимых значений.

Проведенные исследования показали, что тобрамицин в концентрации 2,0 мгк/мл наиболее эффективно подавлял ранний этап адгезии штаммов *P. aeruginosa* ($\chi^2 = 4$; $\chi^2 = 5,84$ при сравнении влияния концентраций 2,0 мгк/мл и 0,25 мгк/мл; 2,0 мгк/мл и 0,12 мгк/мл, ($p < 0,05$). При сравнении ОП БП культур, не подвергавшихся воздействию тобрамицина и ОП БП культур, после воздействия тобрамицина на начальном этапе адгезии также установлена значимая разница только при воздействии тобрамицина в концентрации 2,0 мгк/мл ($U_{эмп} = 3$; есть разница между оп-

тической плотностью до и после воздействия АМП, критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Тобрамицин в тестируемых концентрациях не проникал в суточные биопленки, ОП сформированных БП после воздействия антибиотика была выше, чем у биопленок на начальном этапе адгезии, при воздействии концентраций 2,0 мгк/мл ($U_{эмп} = 1$) и 0,25 мгк/мл ($U_{эмп} = 16$) (критерий Манна – Уитни, разница значима между оптической плотностью формирующейся биопленки и суточных биопленок, $p < 0,05$). Тобрамицин в концентрации 0,12 мгк/мл был не эффективен на обеих стадиях формирования БП.

Заключение. Хорошо известно, что микробиота, формирующая биопленки в легких, действует как защитный барьер для ингаляционных антибиотиков и ингибирование образования биопленок, по-видимому, оказывает положительное влияние на течение МВ [Cystic Fibrosis ... , 2021]. Поэтому концентрации противомикробных препаратов, доставляемые при ингаляции в легкие, должны превышать рекомендуемые для системного введения минимальные ингибирующие концентрации. Наше исследование показало, что воздействовать на биопленки *P. aeruginosa* необходимо АМП в концентрациях, превышающими допустимые значения. Тобрамицин только в концентрации 2,0 мгк/мл препятствовал раннему этапу биопленкообразования, а сформированные биопленки были устойчивы к антибиотикоту во всех тестируемых концентрациях.

Работа выполнена в рамках поисковой технологии, номер гос. регистрации № 123051600027-1.

Литература

- Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* / У. М. Немченко, К. О. Ситникова, Н. Л. Белькова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022. № 26 (5). С. 495–501. DOI: 10.18699/VJGB-22–60
- Переновска П. И., Стоянова Г. П., Стратева Т. В. Антибактериальная активность тобрамицина в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у больных муковисцидозом // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2015. Т. 60, № 1. С. 89–92.
- Тапальский Д. В., Бильский И. А. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. Т. 1. С. 62–67. DOI: 10.36488/cmasc.2018.1
- Cystic Fibrosis: Recent Insights into Inhaled Antibiotic Treatment and Future Perspectives / G. Taccetti, M. Francalanci, G. Pizzamiglio [et al.] // Antibiotics (Basel). 2021. Vol. 22, N 10 (3). P. 338. DOI: 10.3390/antibiotics10030338
- Parkins M. D., Somayaji R., Waters V. J. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis // Clin Microbiol Rev. 2018. Vol. 29, N 31 (4). Art. 00019–18. DOI: 10.1128/CMR.00019–18.

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ ПОЛИАМИНОВ НА МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ

Л. Ю. Нестерова, Д. В. Гельцер, А. Г. Ткаченко

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, larisa.nesterova@bk.ru

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

Биогенные полиамины – алифатические углеводороды, которые имеют в своем составе амино- или иминогруппы, которые при физиологических значениях pH несут положительный заряд. Это позволяет им взаимодействовать с отрицательно заряженными клеточными компонентами, такими как фосфолипиды, нуклеиновые кислоты и другими полианионными структурами. К полиаминам, преимущественно синтезируемым эукариотическими клетками, относятся спермин и спермидин, тогда как для прокариот характерна продукция путресцина, кадаверина и спермидина [Michael, 2016]. Помимо этого, прокариотические клетки обладают транспортными системами, которые позволяют им эффективно поглощать полиамины из среды, в том числе спермин, который, присутствуя в тканях хозяина, может оказать влияние на жизнедеятельность симбионтных и патогенных микроорганизмов. Биогенные полиамины, присутствуя в живых клетках, принимают участие в регуляции таких жизненно важных процессов, как клеточный рост, репликация, регуляция экспрессии генов и транспорт веществ, в том числе при адаптации к стрессовым условиям. Ранее показано, что полиамины могут влиять также на некоторые виды межклеточных взаимодействий у бактерий, в частности – работу систем кворум сенсинг [Нестерова, Негорелова, Ткаченко, 2019].

Целью данной работы является изучение влияния биогенных полиаминов – путресцина, кадаверина, спермидина и спермина – на конъюгацию и биопленкообразование природных штаммов *Escherichia coli*.

В экспериментах по изучению конъюгации в качестве донора плазмидной ДНК использовали *E. coli* N4i pOX38 GenrCmr с хромосомно-опосредованной устойчивостью к гентамицину и плазмид-опосредованной устойчивостью к хлорамфениколу (любезно предоставлен профессором М. Старич-Эрьявец, университет Любляны, Словения). При этом в качестве реципиента использован природный штамм *E. coli* K55, обладающий устойчивостью к ампициллину (любезно предоставлен профессором М. В. Кузнецовой ИЭГМ УрО РАН, Пермь, Россия). Конъюгативную смесь формировали из разведенной в 50 раз LB бульоном ночной культуры штамма-реципиента и разведенной в 25 раз культуры донора в соотношении 4:1. К конъюгативной смеси добавляли растворы гидрохлоридов полиаминов (Sigma, США) в LB-бульоне до конечной концентрации 1 мМ и 5 мМ. После инкубации делали высевы десятикратных разведений культуры на селективные агаризованные среды, содержащие антибиотики. Ча-

стоту конъюгации рассчитывали как отношение количества трансконъюгантов (КОЕ/мл) к числу реципиентов (КОЕ/мл) и выражали в процентах, принимая за 100 % контроль (без добавления полиаминов).

Интенсивность биопленкообразования оценивали методом, предложенным O'Toole, с последующим окрашиванием пленок генцианвиолетом [Genetic approaches ... , 1999].

Показано, что добавка полиаминов в среду приводила к снижению частоты конъюгации *E. coli* в планктонной культуре. Наибольший эффект оказывали спермидин и спермин, которые в концентрации 1 мМ уменьшали относительное количество трансконъюгантов на 51 и 61 %, а в концентрации 5 мМ на 65 и 81 %, соответственно. Путресцин и кадаверин также снижали частоту конъюгации в планктоне: на 36 и 38 % в концентрации 5 мМ, соответственно.

Изучение влияния полиаминов на конъюгацию *E. coli* в биопленке показало, что на ранних стадиях (6 ч) формирования биопленки наблюдалось значительное увеличение относительного количества трансконъюгантов. Статистически значимый эффект наблюдался в присутствии всех исследуемых полиаминов, при этом наибольшее действие оказывали спермидин в концентрации 1 мМ и кадаверин в концентрации 5 мМ, которые повышали относительное количество трансконъюгантов в биопленке более, чем в 3 раза. При оценке влияния полиаминов на конъюгацию в зрелой биопленке после 24 ч инкубации наблюдалось значительное снижение частоты конъюгации. Наибольший эффект в этом случае зафиксирован в присутствии спермидина и спермина, которые в концентрации 1 мМ статистически значимо уменьшали относительное количество трансконъюгантов на 75 и 65 %, а в концентрации 5 мМ на 81 и 70 %, соответственно. Обращает на себя внимание разнонаправленное действие полиаминов на частоту конъюгации в планктонной культуре и биопленке на ранних стадиях её формирования. В связи с этим были проведены исследования влияния биогенных полиаминов на биопленкообразование природных штаммов *E. coli*, которые показали, что все изученные нами полиамины, за исключением кадаверина, увеличивали биомассу биопленок. Наибольшее действие оказывали спермидин и спермин, которые в концентрации от 1 до 5 мМ повышали биопленкообразование исследуемых штаммов на 20–40 %. Учитывая эти данные, мы использовали другой подход к исследованию влияния полиаминов на конъюгацию в биопленке, а именно: биопленка штамма-реципиента формировалась в планшете заранее. Культура донора наносилась на сформированную биопленку реципиента и инкубировалась в присутствии полиаминов в течение 6 и 24 ч. В этом случае действие полиаминов на частоту конъюгации было аналогичным их влиянию в планктонной культуре. В большинстве вариантов наблюдалось снижение частоты конъюгации, однако статистически значимые изменения наблюдались только в присутствии 5 мМ спермина в обеих временных точках (уменьшение на 70 и 85 % соответственно).

Хотя механизмы влияния полиаминов на конъюгацию остаются неизвестными, можно предположить, что одной из причин большого количества трансконъюгантов в биопленке на ранних стадиях ее формирования является повышенная адгезия клеток к субстрату в присутствии полиаминов. У закрепленных неподвижных клеток более эффективно устанавливаются и дольше не нарушаются межклеточные контакты, что приводит к увеличению числа трансконъюгантов среди адгезированных клеток. В то же время нельзя исключить влияние полиаминов на генную экспрессию клеток в биопленке. Кроме того, ранее показано, что под действием полиаминов меняется поверхностный заряд клеток [Нестерова, Цыганов, Ткаченко, 2020], что также может воздействовать на частоту формирования межклеточных контактов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (124020500028-4).

Литература

Нестерова Л. Ю., Негорелова Е. В., Ткаченко А. Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биоплёнкообразования *Vibrio harveyi* // Вестник Перм. ун-та. 2019. № 3. С. 300–308.

Нестерова Л. Ю., Цыганов И. В., Ткаченко А. Г. Влияние биогенных полиаминов на антибиотикочувствительность и поверхностные свойства клеток *Micobacterium smegmatis* // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56, № 4. С. 342–351.

Genetic approaches to study of biofilms / G. A. O'Toole, L. A. Pratt, P. I. Watnick [et al.] // Methods Enzymol. 1999. Vol. 310. P. 91–109.

Michael A. J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea // The Journal of biological chemistry. 2016. Vol. 291, N 29. P. 14896–14903.

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *MYCOBACTERIUM BOVIS* VAR. BCG И *CORYNEBACTERIUM KEFIRRESIDENTII* ИЗ ТУБЕРКУЛЁЗНОГО ОЧАГА

**Е. А. Орлова¹, И. Г. Кондратов¹, Я. Ш. Шварц²,
Е. К. Немкова², О. Б. Огарков¹**

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск,

²Новосибирский НИИ туберкулеза Минздрава России, Новосибирск
elizaveta.a.orlova@gmail.com

Бактериальные ассоциации (биоплёнки) могут быть образованы одним бактериальным штаммом, однако большинство естественных биоплёнок состоят из нескольких видов бактерий. В организме инфицированного человека бактерии способны образовывать биоплёнки с повышенной патогенностью. Возбудитель туберкулёза (ТБ) *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) может формировать поверхностную биоплёнку (pellicle), способствующую уклонению патогена от иммунной системы, неэффек-

тивности лечения антибиотиками и рецидиву инфекции [Biofilm formation in ... , 2021]. Однако остаётся неясным, участвуют ли немногочисленные представители микробиоты лёгких [Анализ разнообразия ... , 2024] в образовании биоплёнок и ассоциации с микобактериями, а также какие последствия это имеет в патогенезе ТБ. Целью данной работы стало исследование влияния представителей микробиоты казеума туберкулёзных очагов и их компонентов на рост микобактерий.

Ранее нами были исследованы более 50 образцов казеума хирургически иссечённых туберкулём, из двух образцов были выделены чистые культуры трёх штаммов факультативно-анаэробных липофильных микроорганизмов – два штамма *Staphylococcus epidermidis* (2206/1 и 2206/2) и один штамм *Corynebacterium kefirresidentii* [Выделение и полногеномное ... , 2023]. Выделенные штаммы характеризовались высокой липазной активностью и относительно небольшим спектром устойчивости к противотуберкулёзным и противомикобактериальным препаратам первого ряда. Клеточные лизаты штаммов в качестве смеси антигенов, а также живые клетки штамма *C. kefirresidentii* использовали для исследования их влияния на рост микобактерий.

Для этого клинический штамм МБТ генотипа Beijing B0/W148 высокой степени патогенности культивировали с клеточными лизатами *C. kefirresidentii* и *S. epidermidis* 2206/1 и 2206/2 (в концентрациях 10 и 100 мкг/мл). Пролиферацию бактерий фиксировали при помощи световой микроскопии, а также с использованием спектрофотометра. Оптическую плотность измеряли в 3 точках каждой лунки при длине волны 450 нм. Через 7 дней культивирования была обнаружена очень слабая антимикобактериальная активность клеточных лизатов – *C. kefirresidentii* в концентрации 10 мкг/мл ($U = 3$, $p = 0,02$), *S. epidermidis* 2206/1 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл ($U = 0,5$, $p = 0,006$; $U = 3,5$, $p = 0,03$ соответственно) и *S. epidermidis* 2206/2 в концентрации 100 мкг/мл ($U = 1$, $p = 0,008$). Максимальный эффект – снижение оптической плотности культуры микобактерий в 1,2 раза, – наблюдался при добавлении клеточных компонентов *S. epidermidis* 2206/1 в концентрации 10 мкг/мл.

Для изучения влияния коринебактерий из туберкулёзного очага на рост микобактерий проводили совместное культивирование вакцинного штамма *M. bovis* var. BCG с клетками штамма *C. kefirresidentii*. Суспензию бактерий в соотношении 1:1 в пяти повторах помещали в 7 мл среды Школьниковой с добавлением 0,1 % Tween-80 и 2 % фетальной сыворотки телят и культивировали при 37 °C в течение 48 дней. В качестве контроля культивировали чистые культуры *M. bovis* var. BCG и *C. kefirresidentii* в тех же условиях. Пролиферацию бактерий оценивали спектрофотометрически при длине волны 565 нм на денситометре DEN-1 в единицах МакФарланда. Мазки окрашивали по Цилло-Нильсену и Леффлеру.

За 2 месяца биомасса изолированных микобактерий увеличилась только в 2 раза, коринебактерии не давали видимого роста, в то время как

совместное культивирование *C. kefirresidentii* с *M. bovis* var. BCG привело к образованию быстро растущей поверхностной биоплёнки на границе раздела фаз воздух – среда (рис.). Оптическая плотность биоплёнки увеличилась в 7,5 раз. По данным микроскопии биоплёнка на ранних этапах состояла из клеток *C. kefirresidentii*, постепенно вытесняющихся клетками микобактерий.

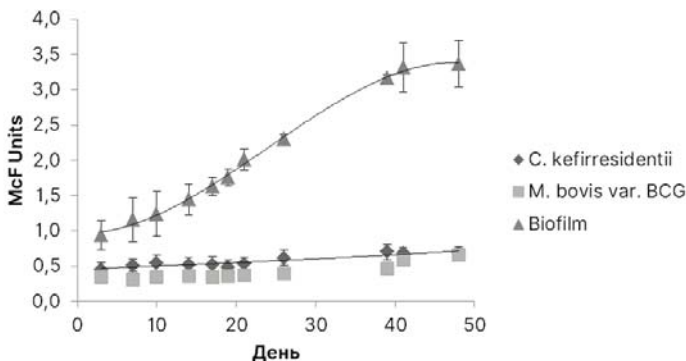


Рис. Динамика роста *M. bovis* var. BCG и *C. kefirresidentii* при изолированном и совместном (Biofilm) культивировании

Мы предполагаем, что коринебактерии и стафилококки относятся к лёгочной патобиоте и могут быть активными участниками процессов сукцессии при организации казеозного некроза при ТБ. Можно предполагать, что совместный рост корине- и микобактерий является следствием кооперативного поведения, например последовательной утилизации питательных веществ (наиболее вероятно, липидов). В то же время внутри клеток выделенных из казеума микроорганизмов могут содержаться компоненты, проявляющие антимикробную активность, такие как гликозидгидролазы, гены которых обнаружены в геномах исследуемых бактерий.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания «Молекулярные, организменные и популяционные закономерности формирования эпидемического процесса антропонозных и трансмиссивных инфекций на территории Северной Азии и сопредельных территориях» (№ 121022500179-0).

Литература

- Анализ разнообразия и функционального потенциала бактериальных сообществ туберкулёзных очагов / Е. А. Орлова, О. Б. Огарков, И. Г. Кондратов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2024. № 1. С. 29–36.
- Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculostearicum*, из туберкулёзного очага / О. Б. Огарков, А. Е. Суздальницкий, И. Г. Кондратов [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. 2023. Т. 8, № 4. С. 12–19.
- Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Chakraborty, S. Bajeli, D. Kaushal [et al.] // Nature communications. 2021. Vol. 12, N 1. Art. 1606.

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*, МУТАНТНЫХ ПО ТИОЛОВЫМ СИСТЕМАМ

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

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН
Пермь, samzu@mail.ru

Фенольные соединения (ФС) растительного происхождения представляют собой нутриенты с высокой биологической активностью, способные модулировать обмен веществ и оказывать значительное влияние на состояние организма человека. На сегодняшний день имеющиеся данные недостаточны для того, чтобы сделать выводы о молекулярных механизмах, приводящих к противоопухолевым, кардио-, нейропротекторным и другим положительным эффектам. Химический анализ ФС указывает на их потенциально высокую редокс-активность [Eghbaliferiz, Iranshahi, 2016]. При этом особенности ассимиляции ФС в организме исключают возможность их прямого антиоксидантного действия в тканях и органах [Koltover, 2010]. В большом количестве фенольные соединения накапливаются в желудочно-кишечном тракте, где основной мишенью их воздействия становятся представители кишечной микрофлоры, которые участвуют в ассимиляции ФС макроорганизмами и, таким образом, косвенно несут свой вклад в положительные эффекты [Kawabata, Yoshioka, Terao, 2019; Polyphenol health effects ... , 2019]. Одним из путей модуляции активности кишечной микрофлоры фенольными соединениями может быть воздействие на бактериальные редокс-системы глутатиона и тиоредоксина.

Редокс-система глутатиона включает трипептид глутатион (GSH), первый фермент синтеза которого кодируется геном *gshA*, глутаредоксины (Grx) (*grxA*, *grxB*, *grxC*, *grxD* и *NrdH*) и глутатионредуктазу (*gor*) [Thioredoxins and Glutaredoxins ... , 2009]. В состав редокс-системы тиоредоксина (Trx) входят Trx1 и Trx2 (*trxA* и *trxC*) и тиоредоксинредуктаза (*trxB*) [Regulation of the OxyR ... , 1999]. Grx и Trx – небольшие белки, осуществляющие восстановление S-S связей в белковых молекулах. Окисленные Grx1, Grx2 и Grx3 неферментативно восстанавливаются GSH, окисленные тиоредоксины и глутатион – с участием тиоредоксинредуктазы и глутатионредуктазы [Thioredoxins and Glutaredoxins ... , 2009]. Субстратами Grx и Trx являются SH-содержащие ферменты, сенсорные и регуляторные белки, многие из которых, в том числе транскрипционный фактор OxyR, играют важную роль в защите от окислительного стресса. Кроме того, Trx и Grx поддерживают в восстановленном состоянии SH-группы белков, спонтанно окисляющиеся в аэробных условиях [Regulation of the OxyR ... , 1999]. Trx и Grx включены в единую регуляторную сеть бактериальной клетки и контролируются с участием OxyR, RpoS и

алармона гуанозинтетрафосфата (ppGpp). Глутатион способен прямо взаимодействовать со всеми типами активных форм кислорода. В присутствии фенольных соединений тиоловые редокс-системы могут менять свою активность [Carreon-Gonzalez, Alvarez-Idaboy, 2023], что непременно сказывается на состоянии бактериальных клеток и их устойчивости к окислительному стрессу, который, как известно, является причиной развития множества патологических состояний.

Целью настоящей работы явилось изучение действия фенольных соединений (кверцетина, галловой, хлорогеновой, кофейной, танниновой и *p*-кумаровой кислот) на биопленкообразование бактерий *Escherichia coli*, мутантных по тиоловым редокс-системам. В работе использовались делеционные мутанты *E. coli* по генам *gshA*, *gor*, *trxA*, *trxB*, *grxA*, *grxB* (Keio collection), а также сконструированные нами двойные мутанты *gshAtrxA*, *gortrxB*.

Культивирование при 37 °C в течение 22–24 ч проводили в 96-луночных полистироловых планшетах со средой M9 с добавлением 4 г/л глюкозы и 5 мМ испытуемых веществ. Интенсивность биопленкообразования оценивали по методике [Measurement of biofilm ... , 2008], окрашивая планшеты генцианвиолетом и оценивая показатель оптической плотности при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра xMark™ (Bio-Rad, США).

В наших условиях в отсутствие фенольных соединений значение показателя удельного биопленкообразования (SBF) у штамма дикого типа составило 0,365±0,03, у испытуемых мутантов данный показатель снижался в 1,4–1,2 раза.

Стимулирующее влияние на биопленкообразование у всех штаммов, за исключением *grxB*-мутанта и двойного мутанта *gshAtrxA*, оказывала танниновая кислота, увеличивая показатель SBF в 1,4–3,5 раза по сравнению с соответствующими контролями. Этот положительный эффект был особенно выражен у мутантов по генам *gshA* и *grxA*.

Почти у всех испытуемых штаммов эллаговая и *p*-кумаровая кислоты, напротив, подавляли SBF на 35–50 % по сравнению с соответствующими контролями. Исключение составил только *gor*-мутант, у которого эллаговая кислота незначительно стимулировала SBF.

В отдельных случаях отмечались слабые модулирующие эффекты в присутствии галловой, хлорогеновой и кофейной кислот.

Наши результаты показывают, что некоторые редокс-активные фенольные соединения природного происхождения могут модулировать биопленкообразование у бактерий *E. coli*, и вследствие этого могут рассматриваться как потенциальные пребиотики, стимулирующие активность и численность представителей кишечной микрофлоры. Полученные данные свидетельствуют о разной степени вовлеченности элементов бактериальных тиоловых систем в процесс биопленкообразования у *E. coli* в присутствии ФС. Требуются дальнейшие исследования роли тиолов в модуляции биопленкообразования фенольными соединениями у бактерий.

Литература

- Carreon-Gonzalez M., Alvarez-Idaboy J. R. The synergy between glutathione and phenols – phenolic antioxidants repair glutathione: closing the virtuous circle – a theoretical insight // *Antioxidants*. 2023. Vol. 12, N 5. P. 1205–1125. DOI: 10.3390/antiox12051125
- Eghbaliferiz S., Iranshahi M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: uptake review of mechanisms and catalyzing metals // *Phytother. Res*. 2016. Vol 30. P. 1379–1391.
- Kawabata K., Yoshioka Y., Terao J. Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols // *Molecules*. 2019. Vol. 24. Art. 370.
- Koltover V. K. Antioxidant biomedicine: from free radical chemistry to systems biology mechanisms // *Russ. Chem. Bull*. 2010. Vol. 59. P. 37–42.
- Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent / P. Naves, G. del Prado, L. Huelves [et al.] // *J. Appl. Microbiol*. 2008. Vol. 105. P. 585–590.
- Polyphenol health effects on cardiovascular and neurodegenerative disorders: a review and meta-analysis / F. Poti, D. Santi, G. Spaggiari [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20, N 2. DOI: 10.3390/ijms20020351
- Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status / F. Aslund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 6161–6165.
- Thioredoxins and Glutaredoxins: unifying elements in redox biology / Y. Meyer, B. B. Buchanan, F. Vignols, J. P. Reichheld // *Annu. Rev. Genet*. 2009. Vol. 43. P. 335–367.

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННОЙ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ СРЕДЫ АНТРОПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Г. А. Сыровацкая¹, Ю. Г. Максимова^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» –
филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, gsyrovackya@gmail.com

²Пермский государственный национальный исследовательский университет
Пермь, yul_max@mail.ru

Нитрилы – органические соединения с функциональной группой $C\equiv N$. Это универсальные предшественники для синтеза разнообразных соединений, высоко реакциспособные благодаря тройной ненасыщенной полярной связи. Они являются растворителями, экстрагентами, мономерами для синтеза полимерных соединений [The Renaissance of Organo ... , 2022]. Нитрилы обнаружены в бактериях, грибах, растениях и животных в морской и наземной средах обитания. Наиболее распространенными нитрилами в природе являются цианогенные гликозиды. Большинство нитрилов токсичны, что обусловлено высвобождением цианида во время их деградации, они инактивируют систему дыхания, прочно связываясь с цитохром-с-оксидазой [Impact of nitriles ... , 2019]. Как деградация токсичных нитрилов в технологиях очистки окружающей среды, так и синтез

амидов и карбоновых кислот из нитрилов может осуществляться микроорганизмами, обладающими ферментами гидролиза нитрилов.

Известны два пути ферментативного гидролиза нитрилов до карбоновых кислот: двустадийный с помощью нитрилгидратазы (ЕС 4.2.1.84) и амидазы (ЕС 3.5.1.4), либо одностадийный нитрилазный (ЕС 3.5.5.1). Этот биотехнологический процесс может проходить в условиях, отличающихся от нормальных «физиологических», в связи с чем возрастает интерес к нитрилгидролизующим бактериям экстремальных биотопов. Изучение адаптационных реакций таких бактерий, в том числе биоупленкообразования, позволяет понять их физиологические особенности, обуславливающие существование в экстремальных биотопах. На основании этого целью работы явилось изучение влияния рН, повышенной минерализации и температуры на биоупленкообразование изолятов нитрилгидролизующих бактерий, выделенных из грунта содового шламохранилища.

На минеральной среде с ацетонитрилом (ацн), либо ацетамидом (ацд) в качестве единственного источника углерода из проб грунта шламоаккумулятора АО «Березниковский содовый завод» были выделены изоляты нитрил- и амидгидролизующих бактерий. Пробы отбирали с поверхности (ССОП), а также на глубине 5 см (ССО35) и 10 см (ССО310).

Изучена способность бактерий к образованию биоупленки. Биоупленки получали в 96-луночном планшете на питательной среде БТН (Россия). После 10 сут. роста при 30 °С отмытую биоупленку окрашивали 0,1 % кристаллическим фиолетовым. Биоупленкообразование оценивали по оптической плотности экстрагированного красителя при 540 нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro «ТЕСАН» (Швейцария). Значения составили от 0,113±0,015 до 1,108±0,194, для дальнейших исследований отобраны 4 изолята с наибольшими из них (рис. 1).

Далее исследовано биоупленкообразование изолятов ССОП 1, ССОП 2, ССОЗ 3 и ССОЗ 4, выделенных на ацетамиде, в условиях повышенной концентрации соли (5–200 г/л NaCl), различной щелочности среды (рН 7–12) и температур в диапазоне от 8 до 37 °С (табл. 1). Определяли отношение ОП₅₄₀ экстрагированного красителя кристаллического фиолетового (биомасса биоупленки) к ОП₅₄₀ суспензии клеток после культивирования.

Установлено, что при концентрациях NaCl выше 50 г/л в среде рост биомассы изолятов снижается. У изолятов ССОП 1 и ССОЗ 3 биоупленкообразование достоверно увеличивается при концентрации 10 и 50 г/л соответственно. В щелочной среде возрастало соотношение биоупленочной к планктонной форме биомассы изолятов. У ССОП 1 и 2 максимальные значения отмечены при рН 11, а у ССОЗ 3 и 4 при рН 12. Повышение температуры инкубации до 37 °С подавляло биоупленкообразование, однако в диапазоне температур от 8 до 15 °С отмечено формирование биоупленок.

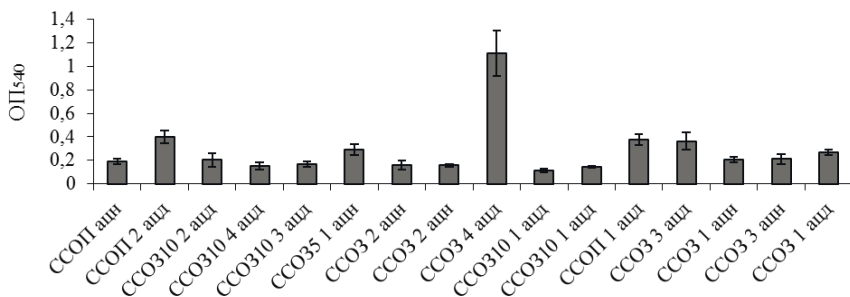


Рис. 1. Биоплёнкообразование нитрилгидролизующих изолятов содового шламохранилища

Таблица

Влияние концентрации NaCl и pH на формирование биоплёнок изолятов, * $p < 0,05$

Условия		ОП 540 нм, биоплёнка/планктонная форма			
		ССОП 1 ацд	ССОП 2 ацд	ССО3 3 ацд	ССО3 4 ацд
NaCl г/л	5	0,154±0,016 (n = 8)	0,236±0,027 (n = 8)	0,151±0,019 (n = 8)	0,143±0,041 (n = 8)
	10	0,536±0,057 (n = 7)*	0,165±0,049 (n = 5)	0,106±0,010 (n = 5)*	0,094±0,020 (n = 4)
	50	0,066±0,010 (n = 6)*	0,165±0,042 (n = 4)	0,479±0,028 (n = 4)*	0,028±0,007 (n = 7)*
pH	7	0,154±0,016 (n = 8)	0,236±0,027 (n = 8)	0,151±0,019 (n = 8)	0,143±0,041 (n = 8)*
	8	0,620±0,123 (n = 5)*	0,548±0,130 (n = 5)*	0,283±0,039 (n = 7)*	0,335±0,080 (n = 7)*
	9	0,492±0,086 (n = 5)*	0,616±0,083 (n = 5)*	0,256±0,035 (n = 7)*	0,342±0,054 (n = 7)*
	10	0,519±0,059 (n = 6)*	0,647±0,059 (n = 5)*	0,268±0,059 (n = 6)*	0,284±0,039 (n = 8)*
	11	0,574±0,083 (n = 8)*	0,851±0,172 (n = 8)*	0,360±0,076 (n = 6)*	0,348±0,067 (n = 7)*
	12	0,429±0,050 (n = 7)*	0,535±0,046 (n = 6)*	0,513±0,103 (n = 6)*	0,409±0,062 (n = 6)*
T, °C	8	0,775±0,041 (n = 7)*	0,420±0,049 (n = 8)*	0,818±0,110 (n = 6)*	4,651±0,892 (n = 7)*
	15	0,969±0,063 (n = 7)*	0,403±0,025 (n = 8)*	1,364±0,107 (n = 7)*	0,455±0,051 (n = 8)*
	30	0,154±0,016 (n = 8)	0,236±0,027 (n = 8)	0,151±0,019 (n = 8)	0,143±0,041 (n = 8)
	37	0,048±0,031 (n = 6)*	0,023±0,004 (n = 7)*	0,119±0,019 (n = 6)	0,022±0,005 (n = 7)*

Таким образом, все бактерии формировали биоплёнки, но её продукция как адаптивная реакция изолятов была не одинакова относительно различных стрессовых факторов. Щелочная среда и пониженные температуры создавали общую для бактерий тенденцию к усилению биоплёнкообразования, тогда как высокая минерализация влияла на образование биоплёнок только у ССОП 1 и ССОЗ 3. При повышении температуры доминирующей формой бактерий оставалась планктонная.

Работа выполнена в рамках госзадания, регистрационный номер 124020500028-4.

Литература

Impact of nitriles on bacterial communities / R. Egelkamp [et al.] // *Frontiers in Environmental Science*. 2019. Vol. 7. DOI: 10.3389/fenvs.2019.00103

The Renaissance of Organo Nitriles in Organic Synthesis / A. Rakshit [et al.] // *Chemistry – An Asian Journal*. 2022. Vol. 17, N 21. Art. e202200792. DOI: 10.1002/asia.202200792

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

Абашина Т. Н. 195
Абубакирова А. М. 151
Агеева М. Н. 64
Азарова Т. С. 216
Алеев В. С. 330
Алейник И. А. 352
Алексеев М. А. 82
Ананьина Л. Н. 93, 330
Андреева Д. В. 360
Андронов Е. Е. 332
Арабова Л. И. 17
Ариповский А. В. 284
Артёмьева И. А. 195
Артемюк А. М. 20
Архипов А. А. 34
Астанкова А. С. 108
Асфха З. А. 195
Ахамуэфуле К. Ч. 258
Ахова А. В. 333
Ахтемова Г. А. 37
Аюшеева Н. Б. 272

Б

Бабич О. О. 58, 103
Бабичева Т. С. 170
Баганова М. Е. 306, 313
Багастья А. Й. 137
Баенгуев Б. А. 213
Баймухаметова Э. А. 21
Бакулина А. В. 94
Балаева Н. А. 352
Балкин А. С. 121
Банзаракцаева Т. Г. 333
Бареева А. Ш. , 219
Бархутова Д. Д. 335, 337, 390
Батаева Ю. В. 97, 405
Бахтиярова А. Х. 58
Баязитова Л. Т. 208
Безлер Н. В. 188, 298
Безматерных И. С. 410
Белимов А. А. 216, 254, 323
Беловежец Л. А. 99, 175, 246
Белоусов Д. С. 99
Белоголова Г. А. 213
Белькова Н. Л. 367, 393, 398, 403, 425
Березина Е. В. 22
Беркутова Е. С. 193
Бессолицина Е. А. 94

Бетехтина А. А. 340
Бигалеева А. Ш. 110
Бизиков П. А. 156, 248
Биланенко Е. Н. 381
Бледных О. В. 24
Бобровницкий С. К. 238
Божко К. Н. 352
Бодров Я. В. 26
Большакова Д. В. 101
Бондарева Л. Л. 301
Бондаренко Г. Н. 374
Бондаренко С. А. 381
Бондаренкова А. Д. 295
Борзенков И. А. 168
Бородин Е. В. 254
Борисова А. Р. 319
Борисова Г. Г. 258
Борисова С. В. 396
Брилкина А. А. 22
Борхерт Е. В. 26
Бояндин А. Н. 132
Брынчикова А. В. 69
Буденкова Е. А. 103
Бульмакова Д. С. 106, 193
Бурханова Г. Ф. 327,
Бурыгин Г. Л. 108
Бут С. Ю. 180
Бутин А. А. 216, 323
Буторова И. А. 238

В

Васильев И. А. 156, 217, 272, 365
Васильева Ю. А. 204, 226
Ванюшкина И. А. 240
Вармадеванти И. 137
Вершинина З. Р. 110
Ветрова С. А. 263
Викторов Н. Б. 323
Вильданова Г. И. 352
Вишневская Н. А. 216, 254
Владимирова А. А. 386,
Воденев В. А. 40, 64
Волков А. Г. 410
Волков Р. А. 210
Волкова Л. В. 410
Вологин С. Г. 267
Волох О. А. 396
Волосникова Е. А. 166
Волченко Н. Н. 303, 387

Вольнец Г. А. 22
Воропаева О. В. 340
Высоцкая Л. Б. 261, 285
Вычик П. В. 269

Г

Габриелян Д. А. 186, 190
Габриелян А. К. 186
Гаврилова Е. А. 112, 210
Гайнуллина К. П. 28
Гайсина Э. М. 114
Галивонджян А. Х. 365
Галиева Г. Ш. 342
Галицкая П. Ю. 342
Галуза О. А. 115, 168
Гальперина А. Р. 219
Гарипова С. Р. 376
Гаффарова Э. Р. 261
Гельцер Д. В. 428
Георгиева М. Л. 381
Герасимчук А. Л. 118, 137
Гилевская К. С. 327
Гильванова Е. А. 285
Гильмутдинова А. И. 204, 226
Гилеп К. А. 365
Глаголева Е. С. 374
Глинская Е. В. 124
Глуценков В. А. 24
Глушень Е. М. 344
Глязнецова Ю. С. 256
Гоголашвили Э. Л. 58
Гоголев Ю. В. 121, 216, 323
Гоголева Н. Е. 121
Голубев Д. М. 124,
Голубев С. Н. 162, 295
Голубева Е. М. 360
Горенкова А. И. 145, 325
Горбенко И. В. 156
Горбунов А. А. 93, 330
Горбунова А. О. 145, 243, 325
Гордеева О. Н. 213
Гордон М. Л. 37
Горшков В. Ю. 274, 290
Горшков А. П. 221, 308
Гостева А. Н. 58
Граскова И. А. 346, 379
Григориади А. С. 224
Григорьева Н. А. 321
Григорян Л. Н. 97
Гринберг М. А. 40, 64
Гродецкая Т. А. 77
Грум-Гржимайло О. А. 381
Гулий О. И. 412

Гусев А. А. 77
Гутник Д. И. 278

Д

Дагурова О. П. 337, 348, 357
Дарказанли М. 258
Дамбаев В. Б. 357
Данилова Е. В. 337
Данилова Н. В. 342
Данилова О. А. 381
Данилова Э. В. 390
Данилова Ю. В. 204, 226
Даренская М. А. 398
Демкина А. О. 365
Дёмкина Е. В. 168
Деханова Е. Н. 231
Дворянинова Е. М. 126, 286
Делеган Я. А. 195
Дегтева Ю. В. 24
Дигрис А. В. 269
Дмитриев А. А. 26, 34, 75, 126, 286
Домблидес Е. А. 44
Дроздова М. С. 233
Дубровская Е. В. 295
Дувалов Е. И. 269
Дунайцев И. А. 405
Дьяконова А. А. 290
Дятлова Ю. А. 350

Е

Егоров Ю. А. 49
Егорова Д. О. 129
Егорова И. Н. 386
Евдокимова О. В. 127
Евлаков П. М. 77
Евстигнеева С. С. 412
Ежков В. О. 112, 210
Ежкова А. М. 112, 210
Елистратова А. А. 231
Еловская Н. А. 327
Енгальчева И. А. 235, 240, 293
Еникеев А. Г. 423
Ерёмин Д. И. 31, 51, 73
Ерофеева А. В. 306
Ербилецкая Н. Л. 132
Ефремова Е. П. 33

Ж

Желтова Е. В. 352
Жернова Д. А. 34, 126, 286
Жернаков А. И. 37
Жуков В. А. 37
Жуланова Н. С. 134, 201
Журина М. В. 371

З

Зенкова А. А. 229
Заболоцкая А. П. 49
Заикина Е. А. 28, 327
Замбалаев А. В. 348
Зайцева С. В. 337, 357
Зайцева Ю. В. 156
Захарова О. В. 77
Захарченко Н. С. 284
Звонарев А. Н. 284
Злобина Ю. А. 39
Зорин Е. А. 37
Зубарев Ю. А. 75
Зугеева Р. Е. 425
Зуева И. Н. 256
Зыкова Д. А. 208

И

Иванова А. В. 40, 64
Ивасенко Д. А. 118, 137
Ивойлова Т. М. 231
Игнатов А. Н. 114
Иминова Л. Р. 195
Иржанова Д. М. 124
Иткина Д. Л. 233
Ищенко А. А. 248

К

Казазаева А. С. 217
Кайгородова И. М. 235
Калацкая Ж. Н. 327
Калашникова Т. В. 139
Камнев А. А. 142, 323, 350, 383
Канапаций Т. А. 168
Каплун А. М. 126, 286
Каракозова М. В. 164, 418
Каракотов С. Д. 352
Карасёва Э. В. 387
Каропова М. С. 156, 217, 272
Кашеварова Н. М. 354
Каширских Е. В. 103
Каюмов А. Р. 112, 143, 160, 203, 208, 210, 416
Келейникова О. В. 306, 313
Кенжегулов О. А. 350,
Кибальник О. П. 42
Киенская К. И. 238
Киричек Е. А. 308
Кириянова Т. Д. 129
Китаева А. Б. 308
Кичко А. А. 316, 332
Клементьев С. В. 58, 60
Клименко Е. С. 398

Клюкова М. С. 37
Кобелев А. В. 60
Ковальчук А. И. 325
Козарь Е. В. 47
Козарь Е. Г. 235, 240, 263, 293, 301
Козырева Л. П. 357
Коломиец Э. И. 101, 149
Колубако А. В. 321
Колышкина С. В. 143
Кондратов И. Г. 406, 433
Кондратьева Л. М. 360
Коннова Т. А. 121
Кононова Л. И. 413
Кононова О. Е. 39
Константинов Ю. М. 156
Коробейникова А. С. 124
Королев Н. А. 129
Коротков Н. А. 115
Корсакова Е. С. 265
Костицын Р. Д. 306, 316
Костюшина Н. В. 103
Кочкина Г. А. 384
Креславский В. Д. 284
Краева А. В. 177, 265
Кривенко Д. А. 217, 365
Крюков А. А. 145, 243, 325
Круглова М. Н. 303, 387
Ксенофонтов Д. Е. 49
Кудряшова Т. Р. 145, 243, 325
Кузнецова В. А. 154
Кузнецова В. Е. 246
Кузнецова М. Вал. 400
Кузнецова М. Вяч. 146
Кузнецова Т. Н. 146
Кузьмина Д. О. 37
Кузьмина Л. Ю. 261, 285
Кудоярова Г. Р. 261
Кудряшова Т. Р. 145, 243, 325
Кулаева О. А. 37
Кулуев А. Р. 47
Кулуев Б. Р. 21, 28, 70, 87, 250
Кущов В. Н. 149
Курбангалиева А. Р. 143
Курчак Н. 332
Курынцева П. А. 252, 342
Кусакин П. Г. 221, 308
Кучарова Е. В. 49
Кырова Е. И. 114

Л

Лаврентьева Е. В. 337, 362
Лактионов Ю. В. 243
Ламажапова Г. П. 51, 90

Кузьмина Л. Ю. 261, 285
Кудоярова Г. Р. 261
Кудряшова Т. Р. 145, 243, 325
Кулаева О. А. 37
Кулуев А. Р. 47
Кулуев Б. Р. 21, 28, 70, 87, 250
Купцов В. Н. 149
Курбангалиева А. Р. 143
Курчак Н. 332
Курьнцева П. А. 252, 342
Кусакин П. Г. 221, 308
Кучарова Е. В. 49
Кырова Е. И. 114

Л

Лаврентьева Е. В. 337, 362
Лактионов Ю. В. 243
Ламажапова Г. П. 51, 90
Ламаханова Б. Ж. 51
Лапенко Н. Г. 306, 316
Ларина М. В. 22
Ласточкина О. В. 376
Латыпова Л. З. 143
Лебедева М. А. 276, 282
Лебединский М. И. 216, 254
Левченко Д. Д. 149
Левчук А. А. 175
Лисовская С. А. 143
Литвиненко З. Н. 360
Лифшиц С. Х. 256
Лобакова Е. С. 374
Лобанов А. Н. 421
Лось Д. А. 186
Лойко Н. Г. 168
Любимова А. В. 31, 54
Любушкина И. В. 80
Лутова Л. А. 20, 33, 69, 72, 276, 282
Лутфуллин М. Т. 267
Лутфуллина Г. Ф. 151, 172

М

Маградзе Е. И. 154
Мазина А. С. 26
Макшакова О. Н. 290
Малахеева А. В. 340
Малева М. Г. 340, 258
Малков Ю. А. 99
Мамаева А. С. 313
Макарова Л. Е. 156, 248
Максимова А. М. 101
Максимова Л. А. 426
Максимова Ю. Г. 423, 438

Мальков Д. И. 56
Мандрик-Литвинкович М. Н. 101
Марданова А. М. 172, 267
Маркова Ю. А. 156, 217, 272, 278, 365
Мартыненко Е. В. 261, 285
Матвеева Д. А. 238
Матвеева Е. А. 246
Матниязов Р. Т. 47
Матюгина Е. Б. 367
Мельников О. И. 180
Мельникова Н. В. 26, 34, 75, 126, 286
Мендограло Е. Ю. 354
Миндубаев А. З. 58, 60
Минзанова С. Т. 60
Минеев Я. П. 250
Миронов В. В. 158
Миронова А. В. 160
Михайлова Е. В. 62, 63
Михайловская В. С. 400
Моисеева Е. В. 303, 387
Моисеева Е. М. 85
Монир Я. М. 112
Мориц А. С. 278, 346, 379
Мурагова А. Ю. 162, 295
Мусин Х. Г. 21, 87, 250
Мустафина А. Д. 87
Мустахимов И. И. 180
Муталлапова Г. И. 203
Мухаметзянов Т. А. 290
Мухина К. С. 263

Н

Назаров А. В. 265
Назаров П. А. 164, 418
Некрасова О. А. 340
Немкова Е. К. 433
Немцова Ю. А. 40, 64,
Несмеянова В. С. 166
Немченко У. М. 425
Нестеренко Л. Е. 369
Нестеркина Д. Д. 124
Нестерова Л. Ю. 354, 431
Нечаев В. Н. 124
Нечаева О. В. 124
Нечаева Ю. И. 265
Никитина Е. В. 112, 210
Николаев Ю. А. 115, 168
Николаева А. А. 267
Николаева А. Н. 172
Николайчик Е. А. 127, 206, 269, 321
Николайчук В. В. 327

Перерва П. А. 365
Перфильева А. И. 346
Печёрина А. А. 64
Пирогова П. А. 40
Пищик В. Н. 313
Плотникова Е. Г. 177
Плешко Е. М. 371
Погодина А. В. 398
Позднякова Н. Н. 170
Поливцева В. Н. 195
Полудова Т. В. 418
Попова Т. М. 172
Похиленко В. Д. 405
Пощенковская Э. А. 69
Приставка Е. О. 175
Проворов Н. А. 332
Пронович Н. А. 252
Протопопова М. В. 66, 72
Птушенко О. С. 377
Птушенко В. В. 377
Пудова Д. С. 196
Пунтус И. Ф. 284
Пусенкова Л. И. 379
Пушкова Е. Н. 26, 34, 126, 286
Пьянкова А. А. 177, 420

Р

Раднагуруева А. А. 337, 348
Ракова В. А. 37
Рассохина И. И. 280
Рахматуллина И. Ф. 70
Ровенская И. А. 344
Роденко Н. А. 24
Рожмина Т. А. 126, 286
Розова О. Н. 180
Романова И. М. 346, 382
Романок Д. А. 37
Рубцова Д. Н. 282
Рудакова Н. Л. 182, 204, 226
Рукавцова Е. Б. 284
Рыбакова Т. Ю. 26
Рыбинская Е. И. 327
Рыбьяков Р. Ю. 365
Рысцова Е. О. 319
Рычкова Л. В. 398
Рябова А. С. 261, 285

С

Сабирзянов Ф. А. 185
Савилов Е. Д. 425
Савиных Г. А. 186
Салата А. 258
Самков А. А. 303, 387

Самойлова З. Ю. 433
Самсонова А. П. 406
Свиридов А. А. 190
Санеева Ю. Н. 188, 298
Сексте Э. А. 216
Селивановская С. Ю. 252, 342
Селиверстова Е. В. 310
Семенов А. А. 423
Семенов М. В. 332
Семенчукова Е. А. 127
Сёмин А. А. 22
Сескутова Е. А. 124
Сигова Е. А. 126, 286
Сидоров М. Ю. 58
Симонова В. Ю. 72
Синиченко Н. А. 240
Синьков В. В. 403
Скакун В. В. 269
Смирнова Г. В. 134, 139, 199, 201, 433
Смолобочкин А. В. 274
Сокольников Л. В. 106, 193, 196
Соловченко А. Е. 374
Соляникова И. П. 195
Сопрунова О. Б. 219
Степанов В. А. 293
Степанова Т. Л. 101, 149
Струнникова О. К. 254
Субботин А. М. 288
Суздальницкий А. Е. 403
Сузина Н. Е. 195
Сулейманова А. Д. 106, 193, 196
Сулима А. С. 37
Сунгурцева И. Ю. 162
Сутормин Д. А. 365
Сутормина Л. В. 139, 199
Суханова А. А. 132
Сынгеева Э. В. 51, 90
Сырова Д. С. 254
Сыровацкая Г. А. 435
Сыромятникова Е. Д. 274
Сысоева А. Н. 118, 137

Т

Таутекенова А. К. 54, 73
Текутов А. Р. 405
Тендюк Н. В. 290
Терентьев В. В. 374
Терёшина В. М. 384
Тимофеев В. Н. 288
Творогова В. Е. 20, 33, 69, 72
Тихонова Т. О. 293
Ткаченко А. Г. 333, 354, 428
Тихонович И. А. 37, 306, 313, 316

Топунов А. Ф. 17
Травкин В. М. 195
Тризна Е. Ю. 143, 160, 203, 208
Трифонов А. А. 137
Трубицин Б. В. 374
Тугарова А. В. 350, 383
Тупикова Г. С. 386
Турковская О. В. 295
Тюленев А. В. 134, 201

У

Ушаков В. А. 235

Ф

Фадеев В. В. 85
Фадеева Ю. В. 85
Фархутдинов Р. Г. 146, 224
Федорова О. А. 77, 298
Федорова М. С. 160, 203
Федотов П. А. 80
Фесенко И. А. 313
Филинова Н. В. 82, 278
Филипъчева Ю. А. 108
Филонов А. Е. 284
Фомина М. Н. 54
Фролова С. Л. 301

Х

Хабибрахманова А. М. 143
Хадеева Е. Р. 365
Хакимова Л. Р. 110
Хамза Хамо 121
Хамидуллин А. Р. 224
Харитончик А. Р. 149
Хасанов Д. И. 182, 204, 226
Хиляс И. В. 231
Хворова С. А. 267
Хмеленина В. Н. 180
Хованкина А. В. 185
Хонина О. В. 306, 316
Хрептугова А. Н. 168
Худокормов А. А. 303, 387
Худяева М. В. 306, 313, 316
Хуснутдинов Э. А. 63

Ц

Цветков В. О. 327
Цыганов В. Е. 221, 308, 310
Цыганова А. В. 221, 308, 310
Цыренова Д. Д. 390

Ч

Чалая О. Н. 256
Чеботарь В. К. 306, 313, 316
Чемерис А. В. 47

Черепанова Е. А. 327
Чернова Д. С. 170
Чернышова О. А. 365
Чижевская Е. П. 306, 313, 316
Чубенко Т. В. 319
Чубукова О. В. 110,
Чумаков Д. С. 412
Чумаков М. И. 85
Чумикина Л. В. 17

Ш

Шавкунов К. С. 180
Шадрина Е. С. 175
Шаньшин Д. В. 166
Шапошников А. И. 216, 254, 323
Шарангович М. А. 206
Шарипова М. Р. 196, 204, 226, 231
Шафикова Т. Н. 423
Шахназарова В. Ю. 216, 254
Шевелева И. С. 88
Шевченко Е. А. 303
Шенаршеева А. А. 90
Шестакова Е. А. 93, 330
Широких И. Г. 94
Шварц Я. Ш. 430
Швец Д. Ю. 21, 87
Шергина О. В. 386
Шибзухова К. А. 374
Шиповская А. Б. 170
Ширшикова Т. В. 231
Шмарев А. Н. 284
Шруб Е. В. 321
Штарк О. Ю. 37

Щ

Щербаков Д. Н. 166

Э

Эль-Регистан Г. И. 115, 168

Ю

Юзихин О. С. 216, 306, 323
Юрков А. П. 145, 243, 325
Юрченко А. Н. 369
Юрченко Е. А. 369, 395

Я

Ядыкова Л. Л. 203, 208
Януцевич Е. А. 381
Яруллина Д. Р. 112, 210
Яруллина Л. Г. 327

S

Starčič Erjavec M. 403

Научное издание

PLAMIC2024

Материалы
IV Международной научной конференции
**«РАСТЕНИЯ И МИКРООРГАНИЗМЫ:
БИОТЕХНОЛОГИЯ БУДУЩЕГО»**

и

III Всероссийской конференции с международным участием
**«МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ»**

Байкальск, 15–22 сентября 2024 г.

ISBN 978-5-9624-2307-4

*Материалы публикуются в авторской редакции
Автор фото на обложке Амир Гильмутдинов*

Подписано в печать 10.09.2024. Формат 60×90 1/16
Уч.-изд. л. 26,9. Усл. печ. л. 27,9. Тираж 50 экз. Заказ 116

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИГУ
664082, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124

Световые микроскопы, Optika (Италия)

Итальянская компания Optika — одна из ведущих компаний по производству учебных и лабораторных микроскопов для биологии и медицины. Модульность конструкции и наличие большого ассортимента аксессуаров позволяют формировать комплектации микроскопов под индивидуальные потребности пользователей.

Основные преимущества

- Прямые, инвертированные и стереоскопические микроскопы
- Методы контрастирования: BF, DF, FLUO (LED и HBO), PH, POL, DIC и др.
- Полная коррекция сферических и хроматических aberrаций
- Большие рабочие расстояния
- Широкое поле зрения
- Эксклюзивная светодиодная система освещения
- Моторизация движения столика по осям X, Y, Z и револьвера объективов
- Эргономика экспертного уровня



Универсальность, качество, цена

Выбирая микроскопы Optika, пользователи получают оборудование высокого европейского уровня по доступным ценам, способное справиться с любой поставленной задачей.

Stormoff®

Официальный дистрибьютор ОПТИКА

143401, Московская область, г. Красногорск, бульвар Строителей, д. 4, корп.1, БЦ «Кубик», сектор Г, 8 этаж
Тел.: +7 495 780 07 95, +7 495 956 05 57
Email: lab@stormoff.ru, www.stormoff.ru

D-PLANTS

R-PLANTS

НАБОРЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК И РНК ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ НА КОЛОНКАХ

Выделенная ДНК подходит для:

- › проведения ПЦР
- › генотипирования
- › ник-трансляции
- › ДНК-секвенирования

Выделенная РНК подходит для:

- › проведения ОТ-ПЦР
- › РНК-секвенирования
- › анализа экспрессии генов



ПРЕИМУЩЕСТВА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРОВ:

Быстрый и воспроизводимый результат

1

Простой, тщательно описанный протокол

2

Широкий спектр применения для множества исследовательских задач

3

Не требует использования фенола и хлороформа

4



Закажите
наборы
на сайте

Оформите заказ с доставкой:

e-mail: sales@biolabmix.ru

Тел: 8 800 600 88 76

www.biolabmix.ru



Biolabmix[®]



НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

- Производство широкого спектра наборов реагентов и оборудования для выделения, амплификации, количественного анализа нуклеиновых кислот и их классического и массового параллельного секвенирования.
- Синтез олигонуклеотидов, зондов для ПЦР в реальном времени, модифицированных олигонуклеотидов (более 100 модификаций).
- Комплексное оснащение молекулярно-генетических лабораторий.
- Обучение молекулярно-генетическим методам исследований.
- Разработка наборов реагентов для молекулярно-генетических исследований на заказ.

127434, г. Москва, Тимирязевская, 42

syntol@syntol.ru +7(495)984-69-93

www.syntol.ru



СИБЛАБСЕРВИС

оснащение лабораторий

г. Иркутск, ул. Фаворского 1Г

тел. +7 (3952) 78-25-78

тел. +7 (3952) 78-25-79



Комплексное оснащение лабораторий

Оборудование, расходные материалы, реагенты

Оборудование для автоматизации лабораторий

Сервисный центр и лицензированные инженеры

ПРОДУКЦИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ



Доставка в разные
регионы России



www.siblabservice.ru

www.siblabpribor.ru

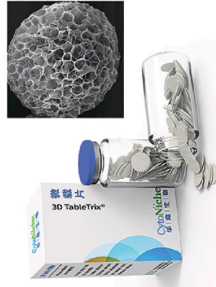


info@sls-irk.ru

sale@siblabservice.ru



Комплексное решение для культивирования прикрепленных клеток с использованием растворимых микроносителей 3D FloTrix



Комплексное решение для культивирования прикрепленных клеток для крупномасштабного производства с использованием растворимых микроносителей 3D FloTrix:

- Для стволовых клеток (МСК, фибробласты)
- Для получения вирусов (293Т и Vero)
- Для производства вакцин (Vero, MDCK, Marc-145, ВНК-21, РК-15, fish brain cells и др.)

Оборудование с одноразовыми расходными материалами:

- **microSPIN** и **miniSPIN** – культивирование в культуральных планшетах и спинер-колбах;
- автоматическое выделение экзосом без центрифугирования **vivaEXO**
- отмывка и сбор клеток **vivaPREP**
- стерильный розлив клеток в криобирки **vivaFILL**



Широкий выбор наборов реагентов для выделения и очистки ДНК и РНК из клеток, тканей, дрожжей, нестандартных и редких образцов



kits.skygen.com

Для связи:



sales@skygen.com



Артикул: EDC336



Артикул: ERC501

Набор "SKYamp Soil DNA Kit"

В наборе SKYamp Soil DNA Kit используется уникальная буферная система, с помощью которой можно полностью удалить гуминовую кислоту из образца почвы. В этом наборе также используются гомогенизирующие частицы диаметром 1мм для процесса лизиса компонентов образца почвы, чтобы гарантировать целостность геномной ДНК. Геномная ДНК, выделенная этим набором, обладает чистотой и высокой целостностью, поэтому она может послужить превосходным шаблоном для дальнейших молекулярно-биологических экспериментов, таких как ПЦР-анализ, рестрикционный анализ и прочие ферментативные реакции.

- Технология выделения: На спин-колонках
- Тип НК: ДНК
- Формат: Набор
- Тип биоматериала: Почва



Набор "Набор SKYamp miRcute miRNA Isolation Kit"

Набор предназначен для селективного выделения микроРНК. При использовании данного набора происходит выделение малых РНК, таких как малые интерферирующие РНК (миРНК), малые ядерные РНК (мяРНК), а также тотальной РНК.

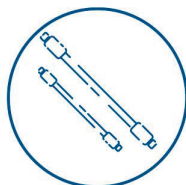
В наборе реализованы инновационные решения, оптимизирован состав лизирующего буфера, а также мембрана кремниевой колонки, способная адсорбировать РНК малых размеров (<200 п.о.), получая высококачественный продукт.

- Технология выделения: На спин-колонках
- Тип биоматериала: Сыворотка/плазма крови
- Тип биоматериала: Растения
- Тип биоматериала: Ткань
- Тип НК: РНК
- Формат: Набор





КОМПЛЕКСНОЕ ОСНАЩЕНИЕ ЛАБОРАТОРИЙ



Хроматографические
колонки



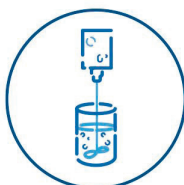
Стандартные
образцы



Растворители
для ВЭЖХ / ОСЧ



Аналитические
приборы



Лабораторное
оборудование



Оборудование
Life Sciences



Микробиология



Химические
реактивы



Биохимические
реактивы

chimmed.ru



Более 20 тысяч позиций в наличии на складе в Москве!

ООО «ТД «ХИММЕД»

Москва, 115230, Каширское шоссе, дом 3, корпус 2, строение 4, этаж 6

Тел.: +7 495 640 4192, mail@chimmed.ru

Новосибирск, 630090, проспект Академика Лаврентьева, 6/1

Тел.: +7 383 330 9346, sibir@chimmed.ru