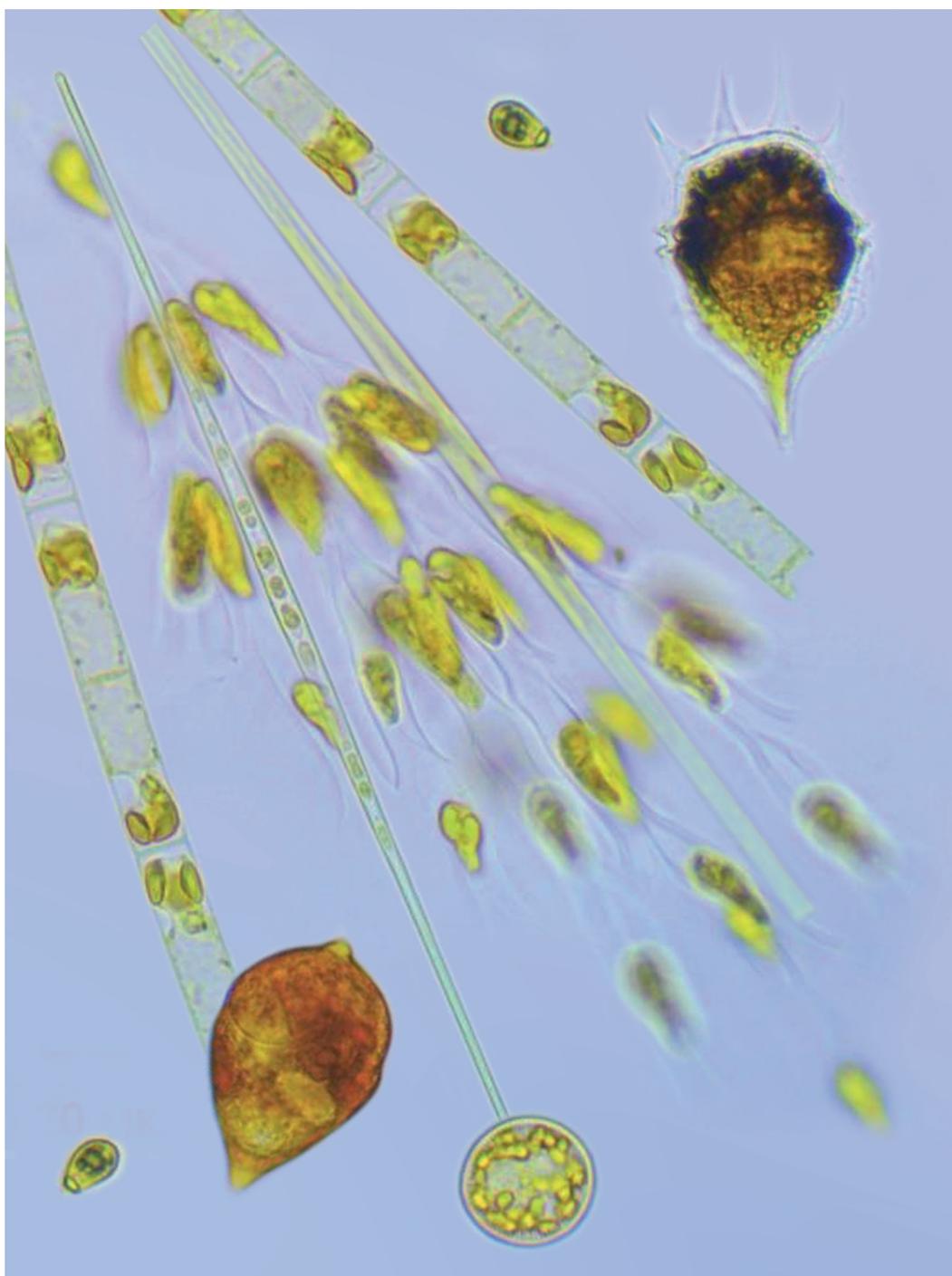


ВАВИЛОВСКИЙ

ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

2022 • 26 • 5



Селекция растений на продуктивность / Репродуктивные технологии / Экологическая генетика /
Материалы конференции «Механизмы адаптации микроорганизмов»

vavilov.ejpub.ru/
biomet.nsc.ru/vogis
vavilov_journal@biomet.nsc.ru
Индекс издания 42153





КЛЕТочНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕШЕНИЯ АКТУАЛЬНЫХ ЗАДАЧ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Онлайн-симпозиум

«Клеточные технологии для решения актуальных задач биологии и медицины»

18 октября 2022 года

Академгородок, Новосибирск, Россия

Глубокоуважаемые коллеги!

Приглашаем вас к участию в онлайн-симпозиуме «Клеточные технологии для решения актуальных задач биологии и медицины», который пройдет в рамках сотрудничества ИЦиГ СО РАН, Фонда научно-технологического развития ХМАО – Югры и Сургутского государственного университета 18 октября 2022 года.

В настоящее время успехи развития клеточных технологий выводят на новый уровень подходы для решения актуальных задач биологии и медицины. Современные работы в области моделирования и исследования молекулярно-генетических основ заболеваний, совершенствование клеточных моделей, разработка методов их безопасного использования требуют внимательного осмысления, анализа и обсуждения.

Предстоящий симпозиум станет площадкой для консолидированного взаимодействия ведущих исследователей, врачей, а также молодых ученых, аспирантов, студентов биологических и медицинских специальностей.

Будем рады видеть вас на симпозиуме!

Информационный сайт симпозиума: <https://conf.icgbio.ru/crispr2022/>

Научный рецензируемый журнал

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

Основан в 1997 г.

Периодичность 8 выпусков в год

DOI 10.18699/VJGB-22-50

Учредители

Сибирское отделение Российской академии наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Межрегиональная общественная организация Вавиловское общество генетиков и селекционеров

Главный редактор

А.В. Кочетов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Заместители главного редактора

Н.А. Колчанов – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

И.Н. Леонова – д-р биол. наук (Россия)

Н.Б. Рубцов – д-р биол. наук, профессор (Россия)

В.К. Шумный – академик РАН, д-р биол. наук, профессор (Россия)

Ответственный секретарь

Г.В. Орлова – канд. биол. наук (Россия)

Редакционная коллегия

Е.Е. Андронов – канд. биол. наук (Россия)

Ю.С. Аульченко – д-р биол. наук (Россия)

О.С. Афанасенко – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Д.А. Афонников – канд. биол. наук, доцент (Россия)

Л.И. Афтанас – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Л.А. Беспалова – академик РАН, д-р с.-х. наук (Россия)

А. Бёрнер – д-р наук (Германия)

Н.П. Бондарь – канд. биол. наук (Россия)

С.А. Боринская – д-р биол. наук (Россия)

П.М. Бородин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

А.В. Васильев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

М.И. Воевода – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Т.А. Гавриленко – д-р биол. наук (Россия)

И. Гроссе – д-р наук, проф. (Германия)

Н.Е. Грунтенко – д-р биол. наук (Россия)

С.А. Демаков – д-р биол. наук (Россия)

И.К. Захаров – д-р биол. наук, проф. (Россия)

И.А. Захаров-Гезехус – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

С.Г. Инге-Вечтомов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

А.В. Кильчевский – чл.-кор. НАНБ, д-р биол. наук (Беларусь)

С.В. Костров – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

А.М. Кудрявцев – чл.-кор. РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.Н. Лаврик – д-р биол. наук (Германия)

Д.М. Ларкин – канд. биол. наук (Великобритания)

Ж. Ле Гуи – д-р наук (Франция)

И.Н. Лебедев – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Л.А. Лутова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

Б. Люгтенберг – д-р наук, проф. (Нидерланды)

В.Ю. Макеев – чл.-кор. РАН, д-р физ.-мат. наук (Россия)

В.И. Молодин – академик РАН, д-р ист. наук (Россия)

М.П. Мошкин – д-р биол. наук, проф. (Россия)

С.Р. Мурсалимов – канд. биол. наук (Россия)

Л.Ю. Новикова – д-р с.-х. наук (Россия)

Е.К. Потокина – д-р биол. наук (Россия)

В.П. Пузырев – академик РАН, д-р мед. наук (Россия)

Д.В. Пышный – чл.-кор. РАН, д-р хим. наук (Россия)

И.Б. Розозин – канд. биол. наук (США)

А.О. Рувинский – д-р биол. наук, проф. (Австралия)

Е.Ю. Рыкова – д-р биол. наук (Россия)

Е.А. Салина – д-р биол. наук, проф. (Россия)

В.А. Степанов – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

И.А. Тихонович – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Е.К. Хлесткина – д-р биол. наук, проф. РАН (Россия)

Э.К. Хуснутдинова – д-р биол. наук, проф. (Россия)

М. Чен – д-р биол. наук (Китайская Народная Республика)

Ю.Н. Шавруков – д-р биол. наук (Австралия)

Р.И. Шейко – чл.-кор. НАНБ, д-р с.-х. наук (Беларусь)

С.В. Шестаков – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Н.К. Янковский – академик РАН, д-р биол. наук (Россия)

Scientific Peer Reviewed Journal

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

VAVILOVSKII ZHURNAL GENETIKI I SELEKTSII

*Founded in 1997**Published 8 times annually*

DOI 10.18699/VJGB-22-50

Founders

Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences

The Vavilov Society of Geneticists and Breeders

Editor-in-Chief

A.V. Kochetov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Deputy Editor-in-Chief

N.A. Kolchanov, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.N. Leonova, Dr. Sci. (Biology), Russia

N.B. Rubtsov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.K. Shumny, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Russia

Executive Secretary

G.V. Orlova, Cand. Sci. (Biology), Russia

Editorial board

O.S. Afanasenko, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.A. Afonnikov, Associate Professor, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.I. Aftanas, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine), Russia

E.E. Andronov, Cand. Sci. (Biology), Russia

Yu.S. Aulchenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

L.A. Bespalova, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

N.P. Bondar, Cand. Sci. (Biology), Russia

S.A. Borinskaya, Dr. Sci. (Biology), Russia

P.M. Borodin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A. Börner, Dr. Sci., Germany

M. Chen, Dr. Sci. (Biology), People's Republic of China

S.A. Demakov, Dr. Sci. (Biology), Russia

T.A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

I. Grosse, Professor, Dr. Sci., Germany

N.E. Gruntenko, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.G. Inge-Vechtomov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khlestkina, Professor of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.K. Khusnutdinova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

A.V. Kilchevsky, Corr. Member of the NAS of Belarus, Dr. Sci. (Biology),

Belarus

S.V. Kostrov, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry), Russia

A.M. Kudryavtsev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

D.M. Larkin, Cand. Sci. (Biology), Great Britain

I.N. Lavrik, Dr. Sci. (Biology), Germany

J. Le Gouis, Dr. Sci., France

I.N. Lebedev, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

B. Lugtenberg, Professor, Dr. Sci., Netherlands

L.A. Lutova, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.Yu. Makeev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Physics and Mathem.),
Russia

V.I. Molodin, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (History), Russia

M.P. Moshkin, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

S.R. Mursalimov, Cand. Sci. (Biology), Russia

L.Yu. Novikova, Dr. Sci. (Agricul.), Russia

E.K. Potokina, Dr. Sci. (Biology), Russia

V.P. Puzyrev, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
RussiaD.V. Pyshnyi, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Chemistry),
Russia

I.B. Rogozin, Cand. Sci. (Biology), United States

A.O. Ruvinsky, Professor, Dr. Sci. (Biology), Australia

E.Y. Rykova, Dr. Sci. (Biology), Russia

E.A. Salina, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

Y.N. Shavrukov, Dr. Sci. (Biology), Australia

R.I. Sheiko, Corr. Member of the NAS of Belarus,
Dr. Sci. (Agricul.), BelarusS.V. Shestakov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaV.A. Stepanov, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
RussiaI.A. Tikhonovich, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia

A.V. Vasiliev, Corr. Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology), Russia

M.I. Voevoda, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Medicine),
RussiaN.K. Yankovsky, Full Member of the RAS, Dr. Sci. (Biology),
Russia

I.K. Zakharov, Professor, Dr. Sci. (Biology), Russia

I.A. Zakharov-Gezekhus, Corr. Member of the RAS,
Dr. Sci. (Biology), Russia

Селекция растений на продуктивность

413 **ОБЗОР**
Использование пырея среднего (*Thinopyrum intermedium*) в селекции.
И.В. Потоцкая, В.П. Шаманин, А.Н. Айдаров, А.И. Морзунов

422 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Повышение эффективности клонального микроразмножения картофеля при инокуляции ризосферными бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. К.Ю. Каргаполова, О.В. Ткаченко, Г.Л. Бурзгин, Н.В. Евсеева, А.А. Широков, Л.Ю. Матора, С.Ю. Щёголев

Репродуктивные технологии

431 **ОБЗОР**
Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные.
А.Л. Левинсон, Т.Н. Игонина, И.Н. Рожкова, Е.Ю. Брусенцев, С.Я. Амстиславский

Экологическая генетика

442 **ОБЗОР**
Аспекты ризосферной микробиоты и их взаимодействие с почвенной экосистемой. Белкасем эль-Амрани (на англ. языке)

Материалы конференции «Механизмы адаптации микроорганизмов», Иркутск

449 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Селективное культивирование бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью из донных осадков реки Оби в Западной Сибири. А.Л. Герасимчук, Д.А. Ивасенко, А.А. Касимова, Ю.А. Франк

458 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков.
И.В. Цыганов, А.Г. Ткаченко

467 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Неспецифическая адаптационная реакция байкальского фитопланктона в ответ на антропогенную нагрузку.
А.А. Никонова, С.С. Воробьева

477 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
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

486 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Патогенный потенциал интестинальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых коров и телят в хозяйствах Пермского края. В.С. Михайловская, Н.Б. Ремезовская, И.Н. Жданова, М. Старич Эрьявец, М.В. Кузнецова

495 **ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**
Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa*. У.М. Немченко, К.О. Ситникова, Н.Л. Белькова, Е.В. Григорова, Н.М. Воропаева, М.В. Сухорева, Е.С. Сухарева, Е.Д. Савилов

Plant breeding for performance

413 **REVIEW**
The use of wheatgrass
(*Thinopyrum intermedium*) in breeding.
I.V. Pototskaya, V.P. Shamanin, A.N. Aydarov, A.I. Morgounov

422 **ORIGINAL ARTICLE**
Improving the efficacy of potato
clonal micropropagation by inoculation
with the rhizosphere bacteria
Azospirillum baldaniorum Sp245
and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2.
*K.Yu. Kargapolova, O.V. Tkachenko, G.L. Burygin,
N.V. Evseeva, A.A. Shirokov, L.Yu. Matora, S.Yu. Shchyogolev*

Reproductive technologies

431 **REVIEW**
Psycho-emotional stress, folliculogenesis,
and reproductive technologies: clinical
and experimental data. *A.L. Levinson, T.N. Igonina,
I.N. Rozhkova, E.Yu. Brusentsev, S.Ya. Amstislavsky*

Ecological genetics

442 **REVIEW**
Aspects of the rhizospheric microbiota
and their interactions with the soil
ecosystem. *Belkacem El Amrani*

Proceedings from the conference "Mechanisms of microbial adaptation", Irkutsk

449 **ORIGINAL ARTICLE**
Selective cultivation of bacterial strains
with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing
activity from bottom sediments of the
Ob River, Western Siberia. *A.L. Gerasimchuk,
D.A. Ivasenko, A.A. Kasymova, Yu.A. Frank*

458 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of biogenic polyamines on sliding
motility of mycobacteria in the presence
of antibiotics. *I.V. Tsyganov, A.G. Tkachenko*

467 **ORIGINAL ARTICLE**
Nonspecific response of Lake Baikal
phytoplankton to anthropogenic impact.
A.A. Nikonova, S.S. Vorobyeva

477 **ORIGINAL ARTICLE**
Effect of copper ions on the associations
of *Azospirillum* bacteria with wheat seedlings
(*Triticum aestivum* L.). *A.Yu. Muratova, E.V. Lyubun,
S.N. Golubev, O.V. Turkovskaya*

486 **ORIGINAL ARTICLE**
Virulence potential of faecal *Escherichia coli*
strains isolated from healthy cows
and calves on farms in Perm Krai.
*V.S. Mihailovskaya, N.B. Remezovskaya, I.N. Zhdanova,
M. Starčić Erjavec, M.V. Kuznetsova*

495 **ORIGINAL ARTICLE**
Effects of antimicrobials on *Pseudomonas*
aeruginosa biofilm formation. *U.M. Nemchenko,
K.O. Sitnikova, N.L. Belkova, E.V. Grigороva, N.M. Voropaeva,
M.V. Sukhoreva, E.S. Sukhareva, E.D. Savilov*

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Использование пырея среднего (*Thinopyrum intermedium*) в селекции

И.В. Потоцкая¹✉, В.П. Шаманин¹, А.Н. Айдаров¹, А.И. Моргунов²

¹ Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

² Продовольственная и сельскохозяйственная организация, Рияд, Саудовская Аравия

✉ iv.pototskaya@omgau.org

Аннотация. Пырей средний (*Th. intermedium*) традиционно применялся в селекции пшеницы для получения пшенично-пырейных гибридов и сортов с интрогрессиями новых генов хозяйственно ценных признаков. Однако в 1980-х гг. в США из множества многолетних видов растений пырей был выбран для доместикации с целью создания сортов двойного направления использования – на зерно (альтернатива многолетней пшенице) и сено. В результате были выведены сорта пырея Kernza (The Land Institute, Канзас) и MN-Clearwater (Миннесотский университет, Миннесота). В Омском ГАУ из популяции *Th. intermedium*, полученной из The Land Institute, массовым отбором наиболее зимостойких биотипов с последующим их объединением создан сорт Сова. Средняя урожайность зерна сорта Сова составляет 9.2 ц/га, зеленой массы – 210.0 ц/га, сена – 71.0 ц/га. Пырей средний – культура с большим производственным потенциалом, полезными экологическими свойствами и ценным зерном для функционального питания. Во многих публикациях показаны преимущества возделывания сорта Kernza по сравнению с однолетними культурами: сокращение стока нитратов в грунтовые воды, увеличение секвестрации почвенного углерода, снижение энергетических и экономических затрат. Однако в России селекционные программы, направленные на доместикацию многолетних культур, весьма ограничены. В настоящем обзоре рассматриваются основные задачи, стоящие перед селекцией и направленные на повышение урожайности зерна и эффективности возделывания пырея среднего в качестве многолетней зерновой и кормовой культуры. Для их решения используются как традиционные, так и современные биотехнологические и молекулярно-цитогенетические подходы. Важнейшей задачей считается передача целевых генов *Th. intermedium* в современные сорта пшеницы и сокращение дозы хроматина, несущего гены нежелательных признаков дикорастущего сородича. Получена первая консенсусная генетическая карта пырея среднего, содержащая 10 029 маркеров и представляющая интерес для поиска ценных генов и их интродукции в геном пшеницы. Представлены результаты исследований по оценке питательных и технологических свойств зерна пырея и полученных из него продуктов питания в сравнении с пшеницей.

Ключевые слова: многолетняя культура; пшеница; доместикация; отбор; гены; экология.

Для цитирования: Потоцкая И.В., Шаманин В.П., Айдаров А.Н., Моргунов А.И. Использование пырея среднего (*Thinopyrum intermedium*) в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):413-421. DOI 10.18699/VJGB-22-51

The use of wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) in breeding

I.V. Pototskaya¹✉, V.P. Shamanin¹, A.N. Aydarov¹, A.I. Morgounov²

¹ Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russia

² Food and Agriculture Organization, Riyadh, Saudi Arabia

✉ iv.pototskaya@omgau.org

Abstract. Wheatgrass (*Th. intermedium*) has been traditionally used in wheat breeding for obtaining wheat-wheatgrass hybrids and varieties with introgressions of new genes for economically valuable traits. However, in the 1980s in the United States wheatgrass was selected from among perennial plant species as having promise for domestication and the development of dual-purpose varieties for grain (as an alternative to perennial wheat) and hay. The result of this work was the creation of the wheatgrass varieties Kernza (The Land Institute, Kansas) and MN-Clearwater (University of Minnesota, Minnesota). In Omsk State Agrarian University, the variety Sova was developed by mass selection of the most winter-hardy biotypes with their subsequent combination from the population of wheatgrass obtained from The Land Institute. The average grain yield of the variety Sova is 9.2 dt/ha, green mass is 210.0 dt/ha, and hay is 71.0 dt/ha. Wheatgrass is a crop with a large production potential, beneficial environmental properties, and valuable grain for functional food. Many publications show the advantages of growing the Kernza variety compared to annual crops in reducing groundwater nitrate contamination, increasing soil carbon sequestration, and reducing energy and economic costs. However, breeding programs for domestication of perennial crops are very limited in Russia. This paper presents an overview of main tasks faced by breeders, aimed at enhancing the yield and cultivating wheatgrass efficiency as a perennial grain and fodder crop. To address them, both traditional and mo-

dern biotechnological and molecular cytogenetic approaches are used. The most important task is to transfer target genes of *Th. intermedium* to modern wheat varieties and decrease the level of chromatin carrying undesirable genes of the wild relative. The first consensus map of wheatgrass containing 10,029 markers was obtained, which is important for searching for genes and their introgressions to the wheat genome. The results of research on the nutritional and technological properties of wheatgrass grain for the development of food products as well as the differences in the quality of wheatgrass grain and wheat grain are presented.

Key words: perennial crop; wheat; domestication; selection; genes; ecology.

For citation: Pototskaya I.V., Shamanin V.P., Aydarov A.N., Morgounov A.I. The use of wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) in breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):413-421. DOI 10.18699/VJGB-22-51

Введение

Одной из актуальных проблем, влияющих на продовольственную безопасность, считается изменение климата, поскольку в засушливых агроландшафтах стран Африки, Азии и Южной Америки урожайность сельскохозяйственных культур, в частности кукурузы, пшеницы и сахарной свеклы, резко снижается (IPCC..., 2019).

Традиционная система сельского хозяйства, основанная на возделывании однолетних культур, подразумевает применение пестицидов и отвальную обработку почвы, что существенно снижает ее плодородие, приводит к эрозии пахотных земель, вымыванию питательных веществ и эмиссии углерода (Stavridou et al., 2016; Vico, Brunzell, 2018). Около 70 % общих выбросов парниковых газов (CO₂, CH₄, N₂O и др.) приходится на внесение и производство азотных удобрений, 10–15 % – на агротехнические приемы по обработке почвы, остальное – на использование пестицидов и регуляторов роста (Berry et al., 2010).

По последним данным, более трех четвертей площади посева сельскохозяйственных культур в мире занимают однолетние культуры, поэтому важным элементом регенеративного земледелия является рациональная структура посевных площадей и повышение биоразнообразия возделываемых культур (de Oliveira et al., 2019). В ближайшие десятилетия расширение посевных площадей под многолетними культурами, в дополнение к однолетним, создаст возможности для перехода сельского хозяйства на более устойчивую траекторию развития, снизит производственные затраты и улучшит состояние агроценозов (Amaducci et al., 2016).

Многолетние культуры имеют более продолжительный вегетационный период, благодаря чему почва дольше покрыта растительностью, обеспечивают накопление углерода в почве и сокращение выбросов парниковых газов (Chimento, Amaducci, 2015; Schipanski et al., 2016). Они обладают повышенной устойчивостью ко многим негативным биотическим и абиотическим факторам среды, формируют мощную корневую систему, улучшающую водопотребление растений, снижают потери питательных веществ в почве (Zeri et al., 2013; Abraha et al., 2016). Примеры успешной доместикации многолетних культур – пырей средний *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey и масличная культура *Silphium integrifolium* Michx. Отдаленная гибридизация однолетних культур с многолетними дикорастущими сородичами проводится во многих научных учреждениях и университетах в мире по созданию таких многолетних культур, как пшеница, сорго, рис, ячмень (Crews et al., 2018).

Биологические и генетические особенности пырея среднего

Аллогексаплоидный вид *Th. intermedium* ($2n = 6x = 42$) (= syn. *Agropyron glaucum* (Desf. ex DC.) Roem. & Schult.) = *Elytrigia intermedia* (Host) Nevski) является многолетним дикорастущим видом, характеризующимся большим разнообразием морфологических признаков и высокой адаптивностью к биотическим и абиотическим стрессам (Размахнин, 2008). Данный вид входит в третичный генетический пул, отличается от всех других видов рода *Thinopyrum* A. Löve высокой скрещиваемостью с мягкой пшеницей (завязываемость гибридных зерен в среднем составляет 24 %) (Gill et al., 2006; Cui et al., 2018). Однако передача мягкой пшенице ценных генов от пырея среднего затруднена, что объясняется ограниченной рекомбинацией хромосом этих видов у отдаленных гибридов. Для переноса генов из гомеологичных хромосом дикорастущего сородича в геном пшеницы используют четыре основных метода: спонтанные транслокации, воздействие радиацией, культура ткани и индуцированные гомеологичные рекомбинации. Последний метод применяют при условии, что целевой ген удален от прицентромерного района, где рекомбинация отсутствует или затруднена (Zhang P. et al., 2017).

Геномный состав *Th. intermedium* (JJSSt) исследовали на протяжении десятилетий. Результаты геномной гибридизации *in situ* (GISH) с использованием меченой ДНК разных диплоидных видов в качестве проб показали, что геном J родственен геному диплоидных видов *Th. bessarabicum* и *Th. elongatum*, а геном J^S – это модифицированная форма генома *Th. elongatum/Th. bessarabicum*. St – основной геном многолетних трав, имеющий большое сходство с геномом рода *Pseudoroegneria*, представители которого служили, вероятно, материнской формой *Th. intermedium* (Chen et al., 1998; Chen, 2005; Mahelka et al., 2011; Крупин и др., 2019).

В 1930-х гг. ученые возлагали большие надежды на отдаленную гибридизацию. В это время Н.В. Цициным в Советском Союзе, а также другими учеными в США и Канаде были начаты работы по созданию многолетней пшеницы путем скрещивания мягкой пшеницы с пыреем средним (Suneson et al., 1963; Цицин, 1978). В Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН (Москва) под руководством академика Н.В. Цицина сформирована уникальная коллекция, включающая октоплоидные формы пшенично-пырейных гибридов (ППГ), полученных с использованием разных видов пырея, а также сорта Истра 1, Зернокормовая 169, Останкинская, Отрастаю-

щая 38 (Упелниек и др., 2012). На основе пшенично-пырейных гибридов ППГ 599 и ППГ 186 впервые были выведены сорта озимой мягкой пшеницы, характеризовавшиеся средним уровнем зимостойкости, а в 1970-х гг. в НИИСХ ЦРНЗ создан сорт Заря, возделываемый на площади свыше 500 тыс. га (Сандухадзе и др., 2021). Современные сорта и линии Самарского НИИСХ Мульти 6R, Лебёдушка, Белянка несут замещенную хромосому 6D(6Ag¹); а сорта Саратовского НИИСХ Тулайковская 5, 10, 100 – замещенную хромосому 6D(6Ag²) от *Th. intermedium* с высокоэффективными генами устойчивости к бурой, стеблевой, желтой ржавчине и мучнистой росе (Сибикеев и др., 2005; Salina et al., 2015). В Западной Сибири получены наборы перспективных ППГ на основе *Th. intermedium* и *Ag. elongatum* для включения их в гибридизацию с сортами озимой и яровой мягкой пшеницы с целью повышения морозостойкости, устойчивости к ржавчинным болезням и качества зерна (Плотникова и др., 2011; Размахнин и др., 2012). В Китае с начала 1950-х гг. ведется планомерная работа по повышению устойчивости пшеницы к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды с использованием *Th. intermedium*, в результате которой ППГ с такими характеристиками, как высокая морозостойкость, устойчивость к болезням, улучшенные кормовые достоинства и быстрое послеуборочное отрастание, привлечены в селекцию многолетней кормовой пшеницы (Cui et al., 2018).

Применяются биотехнологические и молекулярно-цитогенетические подходы для передачи целевого гена в современные сорта пшеницы и сокращения дозы хроматина, несущего гены нежелательных признаков дикорастущего сородича (Крупин и др., 2019). В геном мягкой пшеницы от пырея среднего перенесены гены устойчивости к бурой, стеблевой, желтой ржавчине и мучнистой росе (*Lr38*, *Sr44*, *Yr50*, *Pm40* и *Pm43*), вирусам желтой карликовости ячменя (*Bdv2*, *Bdv3*) и полосатой мозаики пшеницы (*Wsm1*) (Мартынов и др., 2016; Сибикеев и др., 2018; Ryan et al., 2018).

Разработаны молекулярные маркеры для анализа генома *Th. intermedium*, что позволяет целенаправленно переносить гены пырея в геном мягкой пшеницы (Крупин и др., 2011; Li et al., 2016; Сибикеев и др., 2017). В частности, получены молекулярные маркеры, позволяющие выявлять гены пырейного происхождения в геноме пшеницы: CAPS-маркер к гену *Vp-1* используется в селекции на повышение устойчивости к предуборочному прорастанию зерна (Дивашук и др., 2011; Kocheshkova et al., 2017); CAPS-маркер P22F/PRA/PvuII к гену *DREB1* – в селекции на засухоустойчивость пшеницы (Почтовый и др., 2013); молекулярные и цитогенетические маркеры, специфичные для пырейной хромосомы 1St#2, – в селекции для повышения количества белка и клейковины в зерне пшеницы (Li et al., 2013, 2016); маркер WXTN к гену *Wx* – для изменения состава и технологических свойств крахмала (Klimushina et al., 2020); маркеры PLUG, SCAR и *Thi*-GBS – для выявления хромосом J-, J^S- и St-субгеномов пырея (Hu et al., 2012; Tang et al., 2020; Qiao et al., 2021).

Наряду с молекулярными маркерами эффективно используют цитогенетические маркеры для идентификации хромосом и их сегментов от *Th. intermedium*, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками (Yu et al.,

2019; Nikitina et al., 2020). Олигонуклеотиды (*GAA*)₁₀, *pSt122*, *pSc119.2-1*, *Oligo-B11*, *Oligo-pThp3.93*, *pAs1-1*, *pAs1-3*, *AFA-4* флуоресцентной (FISH) и геномной гибридизации (GISH) применяют для визуализации хромосом *Th. intermedium* в пшенично-пырейных гибридах и интрогрессивных линиях (Li et al., 2016; Xi et al., 2019; Wang et al., 2021). Разработаны три цитогенетических маркера тандемных повторов, специфичных для отдельных хромосом пырея у интрогрессивных линий, устойчивых к фосфорodefицитному стрессу (Zhang X. et al., 2021). Наличие надежных маркеров для хромосом пырея расширяет экспериментальные возможности для использования этой культуры в селекции пшеницы.

В 2016 г. получена первая консенсусная генетическая карта пырея среднего, содержащая 10 029 маркеров. В каждой из 21 группы сцепления картировано от 237 до 683 маркеров со средним расстоянием 0.5 cM между маркерами (Kantarski et al., 2017). Данная карта представляет интерес для поиска генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, и их интродукции в геном пшеницы. В картирующей популяции M26×M35 выявлено 111 QTL, ассоциированных с 17 признаками, в том числе несколько высокозначимых QTL, отвечающих за завязываемость семян, высоту растений, массу зерновки, легкость обмолота и другие хозяйственно ценные признаки. Методом ассоциативного картирования идентифицированы 33 QTL, контролирующих размер и массу зерновки. Отбор форм по массе зерновки позволил повысить частоту благоприятных аллелей в популяции пырея среднего более чем на 46 % (Larson et al., 2019).

Селекционные программы по доместикации пырея

Доместикация нового вида является рискованным и непредсказуемым процессом, поскольку при отборе на целевые признаки нельзя быть уверенным в том, как изменятся другие признаки, желательные или нежелательные для селекции. В 1980-х гг. в исследовательском центре Rodale (Кутцтаун, США) пырей средний был выбран из почти ста многолетних видов растений для доместикации и производства зерна. У этого злака относительно крупные для многолетней культуры семена, умеренная ломкость колоса и хороший обмолот зерна, а также высокая биомасса и отличное качество зеленого корма (Wagoner, 1990; Vecker et al., 1992). Выполнены два цикла отборов по агрономическим признакам и размеру зерновки, выделены перспективные биотипы (клоны) пырея, переданные для дальнейшего изучения в The Land Institute (г. Салина, Канзас, США) (DeHaan et al., 2005; Cox et al., 2010).

Проведение циклов отбора в The Land Institute началось с разработки индексов на основе признаков «масса зерна растения», «масса зерна колоса», «процент голозерных семян», «масса 1000 зерен» и «поражение болезнями». С учетом индексов в каждом цикле отбора из 50–70 биотипов, обладавших наиболее благоприятным сочетанием признаков, формировали популяцию для переселения. Уже после двух циклов отбора удалось повысить урожайность зерна с единицы площади на 77 %, а массу одной зерновки – на 23 % (DeHaan et al., 2018). Исследователи The Land Institute и Миннесотского университета (Мин-

несота, США) при доместикации *Th. intermedium* активно использовали результаты по секвенированию генома (*Thinopyrummedium* v2.1 DOE-JGI, https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Tintermedium_v2_1), чтобы заменить трудоемкий отбор по фенотипу методами GWAS и биоинформатики (Vajgain et al., 2019; Crain et al., 2020, 2021).

В результате многолетней работы в The Land Institute создан сорт пырея Kernza (назван в честь жителей штата Канзас), используемый для получения как зерна, так и зеленой массы и сена (сенажа). На второй год возделывания сорта отмечено снижение на 86 % стока нитратов в грунтовые воды, увеличение на 13 % секвестрации почвенного углерода по сравнению с однолетними культурами (Glover et al., 2010; Culman et al., 2013; DeHaan, Van Tassel, 2014; Pugliese et al., 2019). Kernza практически не поражается болезнями и вредителями, посевы требуют меньше агротехнических операций, таких как внесение азотных удобрений, обработка почвы, предпосевное протравливание семян и использование гербицидов для борьбы с сорняками; тем самым снижаются энергетические и экономические затраты (DeHaan et al., 2005; Pugliese et al., 2019).

При продуцировании Kernza в 2012–2016 гг. в штате Канзас внесение азотных удобрений сократилось со 110 кг/га (2012 г.) до 80 кг/га (2016 г.), что положительно сказалось на сокращении эмиссии углерода за этот период – с 513 до 121 г/м². За годы исследований посевы Kernza представляли собой резервуары по накоплению атмосферного углерода – чистый экосистемный обмен (net ecosystem exchange, NEE), который составил 590.4 г С · м⁻² · год⁻¹, что на 50 % превысило выделение CO₂ при дыхании растений (de Oliveira et al., 2018).

В результате пятилетнего возделывания сорта пырея Kernza отмечено его положительное влияние на структуру почвы и урожайность последующих культур в севообороте: усиление микробиологической активности и повышение разнообразия микробиоты почвы в отличие от микробиоты почвы под посевами кукурузы, возделываемой на силос (Jungers et al., 2019). В сравнении с посевами однолетних культур, таких как кукуруза и пшеница, посевы Kernza имели также более высокие коэффициент водопотребления (water-use efficiency, WUE) и интенсивность транспирации (evapotranspiration, ET) – около 97 % в течение всего периода вегетации, благодаря мощной корневой системе и поглощению влаги из более глубоких слоев почвы, что является важным механизмом адаптации в условиях водного дефицита (Suyker, Verma, 2009; Abraha et al., 2015; Sutherlin et al., 2019).

В 2011 г. была начата совместная селекционная программа по улучшению сорта Kernza между The Land Institute и Миннесотским университетом, которая способствовала зарождению коммерческого интереса к этому многолетнему злаку. В Миннесотском университете создан синтетический сорт-популяция преимущественно зернового направления MN-Clearwater (экспериментальный номер MN 1504), который может возделываться на зеленый корм и фураж. Из 2560 клонов популяции Kernza, полученных из The Land Institute, было отобрано семь родительских форм по комплексу признаков: число дней до колошения, высота растения, масса колоса, процентное

содержание зерен при обмолоте, масса зерновки, урожайность зеленой массы для создания синтетической популяции MN-Clearwater. Урожайность зерна MN-Clearwater в среднем за 2017–2018 гг. в пяти пунктах штата Миннесота составила 696 кг/га, а масса 1000 зерен – 6 г. Это короткостебельный сорт (113 см) с хорошим обмолотом (63 %) и невысокой ломкостью стебля – растения практически не полегли в годы исследований (Vajgain et al., 2020). Программы по доместикации и улучшению таких признаков пырея среднего, как крупность зерна, легкость обмолота, снижение ломкости колоса, уменьшение высоты растений, повышение устойчивости к полеганию и болезням, реализуются также в Университете Манитобы (Канада), Университете штата Юта (США) и Университете сельскохозяйственных наук (Уппсала, Швеция) (Cattani, Asselin, 2017).

Внесение оптимальных доз азотных удобрений и соответствующая агротехника повышают урожайность пырея. Так, при посеве осенью у популяции пырея среднего зернового типа (TLI-C2) урожайность зерна была максимальной (961 кг/га) в первый год, при внесении азотных удобрений и постепенно снижалась в последующие годы продуцирования (Jungers et al., 2017). Опыт американских фермеров свидетельствует, что пырей можно возделывать без пересева в течение 4–6 лет, получая чистую прибыль за счет сокращения затрат на производство. Площадь посева, занятая под Kernza в США в 2014 г., составляла примерно 87 га и в 2016 г. увеличилась до 170 га. Для дальнейшего роста посевных площадей, занятых под этой культурой, необходима точная информация об оптимальных способах посева, оценке питательной ценности фуража, о способах поддержания урожайности зерна в течение нескольких лет и борьбы с сорняками (Lanker et al., 2020).

Использование зерна пырея среднего для повышения пищевой и биологической ценности хлеба и хлебобулочных изделий

Важным аспектом популяризации пырея среднего в Америке и странах Европы стало использование зерна Kernza для производства продуктов питания (Zhang X. et al., 2017). Хлебобулочные изделия, крекеры, хлопья, снеки, полученные из зерна пырея, имеют сладковатый ореховый вкус. Компании General Mills и Patagonia Provisions производят продукты из зерна пырея под торговой маркой Kernza®, которая принадлежит The Land Institute. В настоящее время данные компании расширяют рынки сбыта продукции. В штате Миннеаполис открыта сеть кафе Birch Wood, где подают тортिलли и блины, испеченные из муки пырея Kernza (Springmann et al., 2018).

Изучены технологические характеристики зерна пырея, полученные результаты использованы для разработки продуктов питания. По качеству зерно пырея среднего не уступает зерну пшеницы, но в то же время имеются существенные различия (Becker et al., 1991).

Пырей средний характеризуется высоким содержанием белка и клетчатки в цельнозерновой муке – 20 и 16.4 % соответственно, тогда как в цельнозерновой муке пшеницы эти показатели равны 13 и 11 % (Rahardjo et al., 2018). Белок имеет больше незаменимых аминокислот по сравнению с пшеницей, в частности в 1.4 раза больше цистеина

и метионина (Becker et al., 1991). По результатам трехлетнего изучения сорта Сова многолетнего крупнозерного пырея (*Th. intermedium*) в условиях южной лесостепи Западной Сибири содержание белка в зерне варьировало от 18.5 до 20.5 %, причем на третий год продуцирования сорта количество белка увеличилось на 2 %. Вероятно, это связано с возрастом суммарной численности агрономически важных групп микроорганизмов в ризосфере сорта Сова, с увеличением мощности корневой системы и погодными условиями (Шаманин и др., 2021).

Белок клейковины пырея в сравнении с пшеницей содержит меньше высокомолекулярных субъединиц глютенина (ВМСГ), которые сходны по структуре с ВМСГ пшеницы, но имеют меньшую массу – 45–90 кДа по сравнению с 67–120 кДа у пшеницы (Zhang X. et al., 2014). Дефицит ВМСГ с молекулярной массой > 60 кДа в зерне пырея обуславливает слабую газодерживающую способность и эластичность теста, что в свою очередь приводит к низкому хлебопекарному качеству (Marti et al., 2016).

Благодаря малому размеру зерновок пырея в них содержится значительно меньше крахмала (46.7 %) в сравнении с пшеницей (72 %), а также больше белков альбуминов и глобулинов в алейроновом слое. Однако в процессе доместикации масса зерновки была увеличена на 23 % (DeNaan et al., 2018), что привело к увеличению доли эндосперма в зерновке и, соответственно, крахмала. Состав компонентов крахмала, влияющий на его пищевые и технологические свойства, можно регулировать с помощью комбинаций аллелей генов *Wx Th. intermedium*, влияющих на содержание амилозы в крахмале (Klimushina et al., 2020). В сравнении с крахмалом пшеницы крахмал пырея имеет высокую долю длинных амилозных цепей, более низкую температуру желатинизации, что снижает вязкость, ретроградность крахмала и делает его пригодным для производства хлебобулочных изделий с более низким гликемическим индексом (Zhong et al., 2019). *Th. intermedium* может использоваться также в смеси с сильной пшеницей для производства хлебобулочной продукции с низким содержанием клейковины (Marti et al., 2015; Rahardjo et al., 2018).

Смешивание муки из зерна пырея и твердой пшеницы в соотношении 50:50 способствует хорошему балансу между функциональными характеристиками и пищевыми качествами хлебобулочных изделий; в частности, печенье получается по качеству такое же, как из обычной пшеничной муки. Кроме того, повышенное содержание клетчатки и антиоксидантов в хлебобулочных изделиях из муки пырея делает их особенно полезными для здоровья человека (Marti et al., 2016).

Сорт крупнозерного пырея среднего Сова – альтернатива многолетней пшенице

Омский ГАУ инициировал работу по возделыванию многолетних образцов пшеницы, полученных из международной коллекции CIMMYT, и популяций пырея, созданных в The Land Institute. Город Омск стал одним из пунктов при мультилокационном испытании гермоплазмы многолетних культур, результаты которого представлены в работе R.C. Hayes с коллегами (Hayes et al., 2018). Создан сорт Сова массовым отбором перезимовавших биотипов из по-



Рис. 1. Сорт Сова 2-го года продуцирования. АО «Нива», Павлоградский район Омской области, 2020 г.



Рис. 2. Зерновки яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Памяти Азиева (а) и пырея среднего *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey сорта Сова (б), опытное поле Омского ГАУ.

пуляции *Th. intermedium*, полученной из The Land Institute. Проводили несколько циклов отбора по признакам зимостойкости и продуктивности колоса. Оценивали компоненты продуктивности у 100 колосьев по следующим признакам: масса и длина колоса, число колосков и зерен в колосе, число зерен в колоске, масса зерна с колоса. Из выделенных биотипов для их целенаправленного перепылления была сформирована синтетическая популяция, адаптированная к условиям южной лесостепи Западной Сибири. В 2020 г. сорт крупнозерного пырея Сова включен в Госреестр селекционных достижений и рекомендован для возделывания по всем регионам России (рис. 1 и 2).

Сорт Сова может возделываться как культура двойного направления – на зерно и кормовые цели. Средняя урожайность зерна составляет 9.2 ц/га, зеленой массы – 210.0 ц/га, сена – 71.0 ц/га (Шаманин и др., 2021). В Омском ГАУ получают оригинальные семена сорта Сова с последующим производством категории элиты в трех базовых семеноводческих хозяйствах: КФХ «Тритикум», АО «Нива» и КФХ «Говин». В 2020 г. выращено около 5 т семян сорта Сова для реализации фермерским хозяйствам Омской области. Средняя урожайность зерна в южной лесостепной и степной зонах Омской области составила 0.4–0.6 т/га.

Несмотря на определенный прогресс, достигнутый при реализации отдельных селекционных программ, существует немало задач, которые требуют дальнейшего селекционного решения, для повышения эффективности возделывания пырея в качестве многолетней зерновой

культуры. Прежде всего, необходимо увеличить урожайность зерна пырея, которая значительно ниже, чем у яровой пшеницы. Более низкая урожайность у пырея, возможно, объясняется тем, что часть энергии растения расходуют на развитие корневой системы и многолетние перезимовки. Дальнейший рост урожайности пырея может быть достигнут многократным отбором, направленным на увеличение массы 1000 зерен за счет целенаправленного снижения длины стебля и озерненности колоса, о чем свидетельствуют результаты исследований, в которых отмечена отрицательная взаимосвязь массы 1000 зерен с длиной стебля ($r = -0.3, p = 0.05$) и числом зерен в колосе ($r = -0.5, p = 0.01$) (Шаманин и др., 2021). Использование геномных технологий и молекулярного маркирования для отбора генотипов с ценными признаками в значительной мере будет способствовать повышению эффективности селекции на увеличение урожайности зерна этой многолетней культуры.

Эффективные приемы семеноводства и агротехника возделывания пырея в конкретных агроклиматических зонах также являются резервом повышения урожайности культуры. Для производства хлеба и кондитерских изделий из зерна пырея, обладающих функциональными свойствами, необходимы разработка технологий для пищевой промышленности и маркетинг востребованности населением данной продукции, который позволит сформировать устойчивый спрос этой культуры на рынке.

Заключение

Приведенный обзор мировых исследований свидетельствует, что пырей средний – культура с большим производственным потенциалом, полезными экологическими свойствами и ценным зерном для функционального питания. Возделывание *Th. intermedium* и других многолетних культур – сорго, риса, ячменя, силфи, луговых и пастбищных трав – в сельском хозяйстве сулит не только экологическую, но и социальную, экономическую выгоду, особенно в связи с вызовами, обусловленными потеплением климата, необходимостью снижения парникового эффекта, в том числе от сельскохозяйственного производства. Зерно данного вида пырея можно использовать для производства хлебобулочных и кондитерских изделий с улучшенной питательной ценностью, а все растение – на зеленую массу, сено, сенаж. Пырей средний обладает повышенной устойчивостью ко многим негативным биотическим и абиотическим факторам среды, формирует мощную корневую систему, улучшающую водопотребление растений, снижает потери питательных веществ в почве и эмиссию углерода. Создание сортов пырея среднего Kernza (The Land Institute, США) и Сова (Омский ГАУ, Россия) свидетельствует о перспективности селекционного улучшения культуры. Учитывая, что урожайность зерна *Th. intermedium* значительно ниже, чем у возделываемых однолетних зерновых культур, необходимы новые селекционные программы, направленные на повышение массы 1000 зерен и технологичности возделывания в конкретных агроклиматических зонах. Для популяризации новой культуры на рынке требуются активный маркетинг и разработка технологий переработки зерна пырея для производства продуктов функционального питания.

Список литературы / References

- Дивашук М.Г., Крупин П.Ю., Фесенко И.А., Белов В.И., Разумова О.В., Коротаева А.А., Карлов Г.И. О возможности применения генов-гомологов генов *Vp-1 (Viviparous-1)* пырея в улучшении мягкой пшеницы. *С.-х. биология*. 2011;46(5):40-44.
[Divashuk M.G., Kroupin P.Yu., Fesenko I.A., Belov V.I., Razumova O.V., Korotaeva A.A., Karlov G.I. About possible use of *Agropyron Vp-1 (Viviparous-1)* genes-homolog for improvement of soft wheat. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2011;46(5):40-44. (in Russian)]
- Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Использование генетического потенциала многолетних дикорастущих злаков в селекционном улучшении пшеницы. *С.-х. биология*. 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409rus.
[Kroupin P.Yu., Divashuk M.G., Karlov G.I. Gene resources of perennial wild cereals involved in breeding to improve wheat crop. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2019;54(3):409-425. DOI 10.15389/agrobiology.2019.3.409eng.]
- Крупин П.Ю., Дивашук М.Г., Фесенко И.А., Карлов Г.И. Адаптация микросателлитных SSR-маркеров пшеницы для анализа геномов пырея среднего, пырея удлиненного и пшенично-пырейных гибридов. *Изв. Тимирязев. с.-х. академии*. 2011;3:49-57.
[Kroupin P.Yu., Divashuk M.G., Fesenko I.A., Karlov G.I. Adaptation of microsatellite SSR-markers of wheat for the genome analysis of wheatgrass, intermediate wheatgrass, and wheat-wheatgrass hybrids. *Izvestiya Timiryazevskoy Sel'skhozjajstvennoj Akademii = Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2011;3:49-57. (in Russian)]
- Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Крупнов В.А. Генеалогический анализ использования двух видов пырея (*Agropyron*) в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на устойчивость к болезням. *Генетика*. 2016;52(2):179-188. DOI 10.7868/S0016675816020077.
[Martynov S.P., Dobrotvorskaya T.V., Krupnov V.A. Genealogical analysis of the use of two wheatgrass (*Agropyron*) species in common wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding for disease resistance. *Russ. J. Genet.* 2016;52(2):154-163. DOI 10.1134/S1022795416020071.]
- Плотникова Л.Я., Серюков Г.М., Шварц Ю.К. Цитофизиологические механизмы устойчивости к бурой ржавчине у пшенично-пырейных гибридов, созданных на основе *Agropyron elongatum*. *Микология и фитопатология*. 2011;45(5):443-454.
[Plotnikova L.Ya., Seryukov G.M., Shvarts Yu.K. Cytophysiological resistance mechanisms to leaf rust in wheat-Agropyron hybrids created on the base of *Agropyron elongatum*. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2011;45(5):443-454. (in Russian)]
- Почтовый А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г. Создание молекулярных маркеров на гены *DREB* пырейного происхождения, обеспечивающих повышение засухоустойчивости в геномах злаков. *Вестн. Башкир. ун-та*. 2013;18(3):745-747.
[Pochtovy A.A., Karlov G.I., Divashuk M.G. Creation of molecular markers of *DREB* genes of wheatgrass origin, improving drought tolerance in cereal genomes. *Vestnik Bashkirskogo Universiteta = Bulletin of the Bashkir University*. 2013;18(3):745-747. (in Russian)]
- Размахнин Е.П. Генофонд пырея сизого как источник расширения биоразнообразия пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2008;12(4):701-709.
[Razmakhnin E.P. The gene pool of *Agropyron glaucum* as a source for increasing common wheat biodiversity. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2008;12(4):701-709. (in Russian)]
- Размахнин Е.П., Размахнина Т.М., Козлов В.Е., Гордеева Е.И., Гончаров Н.П., Галицын Ю.Г., Вепрев С.Г., Чекуров В.М. Получение высокоморозостойких форм пшенично-пырейных гибридов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):240-249.

- [Razmakhnin E.P., Razmakhnina T.M., Kozlov V.E., Gordeeva E.I., Goncharov N.P., Galitsyn Y.G., Veprev S.G., Chekurov V.M. Raise of high frost-resistant Agropyron-Triticum hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):240-249. (in Russian)]
- Сандухадзе Б.И., Мамедов Р.З., Крахмалёва М.С., Бугрова В.В. Научная селекция озимой мягкой пшеницы в Нечерноземной зоне России: история, методы и результаты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(4):367-373. DOI 10.18699/VJ21.53-о.
- [Sandukhadze B.I., Mamedov R.Z., Krakhmalyova M.S., Bugrova V.V. Scientific breeding of winter bread wheat in the Non-Chernozem zone of Russia: the history, methods and results. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(4):367-373. DOI 10.18699/VJ21.53-о.]
- Сибикеев С.Н., Бадаева Е.Д., Гульяева Е.И., Друзин А.Е., Шишкина А.А., Драгович А.Ю., Крупин П.Ю., Карлов Г.И., Кхуат Т.М., Дивашук М.Г. Сравнительный анализ 6Ag¹ и 6Ag² хромосом *Agropyron intermedium* (Host) Beauv у сортов и линий мягкой пшеницы с пшенично-пырейными замещениями. *Генетика*. 2017;53(3):298-309. DOI 10.7868/S0016675817030110.
- [Sibikeev S.N., Badaeva E.D., Gulyaeva E.I., Druzhin A.E., Shishkina A.A., Dragovich A.Yu., Kroupin P.Yu., Karlov G.I., Khuat T.M., Divashuk M.G. Comparative analysis of *Agropyron intermedium* (Host) Beauv 6Ag¹ and 6Ag² chromosomes in bread wheat cultivars and lines with wheat-wheatgrass substitutions. *Russ. J. Genet*. 2017;53(3):314-324. DOI 10.1134/S1022795417030115.]
- Сибикеев С.Н., Друзин А.Е., Власовец Л.Т., Калинин Т.В., Голубева Т.Д. Стратегия использования интрогрессивных генов устойчивости к листовой ржавчине в селекции яровой мягкой пшеницы. *Аграр. вестн. Юго-Востока*. 2018;2(19):15-16.
- [Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Vlasovets L.T., Kalintseva T.V., Golubeva T.D. The strategy of using introgression genes for resistance to leaf rust in the spring bread wheat breeding. *Agrarnyj Vestnik Jugo-Vostoka = Agrarian Reporter of South-East*. 2018;2(19):15-16. (in Russian)]
- Сибикеев С.Н., Крупнов В.А., Воронина С.А., Бадаева Е.Д. Идентификация чужеродной хромосомы у линии мягкой пшеницы Мульти 6R. *Генетика*. 2005;41(8):1084-1088.
- [Sibikeev S.N., Krupnov V.A., Voronina S.A., Badaeva E.D. Identification of an alien chromosome in the bread wheat line Multi 6R. *Russ. J. Genet*. 2005;41(8):885-889. DOI 10.1007/s11177-005-0176-8.]
- Упельник В.П., Белов В.И., Иванова Л.П., Долгова С.П., Демидов А.С. Наследие академика Н.В. Цицина – современное состояние и перспективы использования коллекции промежуточных пшенично-пырейных гибридов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(3):667-674.
- [Upelnik V.P., Belov V.I., Ivanova L.P., Dolgova S.P., Demidov A.S. Heritage of Academician N.V. Tsitsin: state-of-the-art and potential of the collection of intermediate wheat × couch grass hybrids. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(3):667-674. (in Russian)]
- Цицин Н.В. Многолетняя пшеница. М., 1978.
- [Tsitsin N.V. Perennial Wheat. Moscow, 1978. (in Russian)]
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Айдаров А.Н., Шепелев С.С., Чурсин А.С., Потоцкая И.В., Хамова О.Ф., Дехан Л.Р. Крупнозерный сорт пырея сизого (*Thinopyrum intermedium*) Сова как альтернатива многолетней пшенице. *С.-х. биология*. 2021;56(3):450-464. DOI 10.15389/agrobiology.2021.3.450rus.
- [Shamanin V.P., Morgounov A.I., Aydarov A.N., Shepelev S.S., Chursin A.S., Pototskaya I.V., Khamova O.F., Dehaan L.R. Large-grained wheatgrass variety Sova (*Thinopyrum intermedium*) as an alternative to perennial wheat. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2021;56(3):450-464. DOI 10.15389/agrobiology.2021.3.450rus. (in Russian)]
- Abraha M., Chen J., Chu H., Zenone T., John R., Su Y.J., Hamilton S.K., Robertson G.P. Evapotranspiration of annual and perennial biofuel crops in a variable climate. *Glob. Change Biol. Bioenergy*. 2015;7(6):1344-1356. DOI 10.1111/GCBB.12239.
- Abraha M., Gelfand I., Hamilton S.K., Shao C., Su Y.J., Robertson G.P., Chen J. Ecosystem water-use efficiency of annual corn and perennial grasslands: contributions from land-use history and species composition. *Ecosystems*. 2016;19(6):1001-1012. DOI 10.1007/s10021-016-9981-2.
- Amaducci S., Facciotto G., Bergante S., Perego A., Serra P., Ferrarini A., Chimento C. Biomass production and energy balance of herbaceous and woody crops on marginal soils in the Po valley. *Glob. Change Biol. Bioenergy*. 2016;9(1):31-45. DOI 10.1111/gcbb.12341.
- Bajgain P., Zhang X., Anderson J.A. Genome-wide association study of yield component traits in Intermediate Wheatgrass and implications in genomic selection and breeding. *G3: Genes Genomes Genetics (Bethesda)*. 2019;9(8):2429-2439. DOI 10.1534/g3.119.400073.
- Bajgain P., Zhang X., Jungers J.M., DeHaan L.R., Heim B., Sheaffer C.C., Wyse D.L., Anderson J.A. MN-Clearwater, the first food-grade intermediate wheatgrass (*Kernza* perennial grain) cultivar. *J. Plant Regist.* 2020;14(3):288-297. DOI 10.1002/plr.2.20042.
- Becker R., Meyer D., Wagoner P., Saunders R.M. Alternative crops for sustainable agricultural systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 1992; 40(1-4):265-274. DOI 10.1016/0167-8809(92)90097-U.
- Becker R., Wagoner P., Hanners G.D., Saunders R.M. Compositional, nutritional and functional-evaluation of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *J. Food Process. Preserv.* 1991;15(1): 63-77. DOI 10.1111/j.1745-4549.1991.tb00154.x.
- Berry P.M., Kindred D.R., Olesen J.E., Jorgensen L.N., Paveley N.D. Quantifying the effect of interactions between disease control, nitrogen supply and land use change on the greenhouse gas emissions associated with wheat production. *Plant Pathol.* 2010;59(4):753-763. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02276.x.
- Cattani D.J., Asselin S.R. Extending the growing season: forage seed production and perennial grains. *Can. J. Plant Sci.* 2017;98(2):235-246. DOI 10.1139/cjps-2017-0212.
- Chen Q. Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA as a probe – a landmark approach for *Thinopyrum* genome research. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1-3):350-359. DOI 10.1159/000082419.
- Chen Q., Conner R.L., Laroche A., Thomas J.B. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* using genomic in situ hybridization. *Genome*. 1998;41(4):580-586. DOI 10.1139/G98-055.
- Chimento C., Amaducci S. Characterization of fine root system and potential contribution to soil organic carbon of six perennial bioenergy crops. *Biomass Bioenergy*. 2015;83(12):116-122. DOI 10.1016/j.biombioe.2015.09.008.
- Cox T.S., Van Tassel D.L., Cox C.M., Dehaan L.R. Progress in breeding perennial grains. *Crop Pasture Sci.* 2010;61(7):513-521. DOI 10.1071/CP09201.
- Crain J., Bajgain P., Anderson J., Zhang X., DeHaan L., Poland J. Enhancing crop domestication through genomic selection, a case study of intermediate wheatgrass. *Front. Plant Sci.* 2020;11(3):319. DOI 10.3389/fpls.2020.00319.
- Crain J., Haghhighattalab A., DeHaan L., Poland J. Development of whole-genome prediction models to increase the rate of genetic gain in intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) breeding. *Plant Genome*. 2021;14(4):e20089. DOI 10.1002/tpg2.20089.
- Crews T.E., Carton W., Olsson L. Is the future of agriculture perennial? Imperatives and opportunities to reinvent agriculture by shifting from annual monocultures to perennial polycultures. *Glob. Sustain.* 2018;1(e11):1-18. DOI 10.1017/sus.2018.11.
- Cui L., Ren Y., Murray T.D., Yan W., Guo Q., Niu Y., Sun Y., Li H. Development of perennial wheat through hybridization between wheat and wheatgrasses: a review. *Engineering*. 2018;4(4):507-513. DOI 10.1016/j.eng.2018.07.003.
- Culman S.W., Snapp S.S., Ollenburger M., Basso B., DeHaan L.R. Soil and water quality rapidly responds to the perennial grain *Kernza* wheatgrass. *Agron. J.* 2013;105(3):735-744. DOI 10.2134/agronj 2012.0273.

- DeHaan L.R., Christians M., Crain J., Poland J. Development and evolution of an Intermediate wheatgrass domestication program. *Sustainability*. 2018;10(5):1499. DOI 10.3390/SU10051499.
- DeHaan L.R., Van Tassel D.L. Useful insights from evolutionary biology for developing perennial grain crops. *Am. J. Bot.* 2014;101(10):1801-1819. DOI 10.3732/ajb.1400084.
- DeHaan L.R., Van Tassel D.L., Cox T.S. Perennial grain crops: a synthesis of ecology and plant breeding. *Renew. Agric. Food Syst.* 2005;20(1):5-14. DOI 10.1079/RAF200496.
- de Oliveira G., Brunzell N.A., Crewsb T.E., DeHaan L.R., Vicoc G. Carbon and water relations in perennial Kernza (*Thinopyrum intermedium*): an overview. *Plant Sci.* 2019;295(6):110279. DOI 10.1016/j.plantsci.2019.110279.
- de Oliveira G., Brunzell N.A., Sutherlin C.E., Crews T.E., DeHaan L.R. Energy, water and carbon exchange over a perennial Kernza wheatgrass crop. *Agric. For. Meteorol.* 2018;249(2):120-137. DOI 10.1016/J.AGRFORMET.2017.11.022.
- Gill B.S., Friebe B., Raupp W.J., Wilson D.L., Cox T.S., Sears R.G., Brown-Guedira G.L., Fritz A.K. Wheat Genetics Resource Center: the first 25 years. *Adv. Agron.* 2006;85(12):73-136. DOI 10.1016/S0065-2113(05)89002-9.
- Glover J.D., Reganold J.P., Bell L.W., Borevitz J., Brummer E.C., Buckler E.S., Cox C.M., Cox T.S., Crews T.E., Culman S.W., DeHaan L.R., Eriksson D., Gill B.S., Holland J., Hu F., Hulke B.S., Ibrahim A.M.H., Jackson W., Jones S.S., Murray S.C., Paterson A.H., Ploschuk E., Sacks E.J., Snapp S., Tao D., Van Tassel D.L., Wade L.J., Wyse D.L., Xuet Y. Agriculture. Increased food and ecosystem security via perennial grains. *Science*. 2010;328(5986):1638-1639. DOI 10.1126/science.1188761.
- Hayes R.C., Wang S., Newell M.T., Turner K., Larsen J. The performance of early-generation perennial winter cereals at 21 sites across four continents. *Sustainability*. 2018;10(4):1124. DOI 10.3390/su10041124.
- Hu L., Li G., Zhan H., Liu C., Yang Z. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat – *Thinopyrum intermedium* derivative lines. *J. Genet.* 2012;91(2):e69-e74.
- IPCC, 2019: Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems [P.R. Shukla, J. Skea, E. Calvo Buendia, V. Masson-Delmotte, H.-O. Pörtner, D.C. Roberts, P. Zhai, R. Slade, S. Connors, R. van Diemen, M. Ferrat, E. Haughey, S. Luz, S. Neogi, M. Pathak, J. Petzold, J. Portugal Pereira, P. Vyas, E. Huntley, K. Kissick, M. Belkacemi, J. Malley (Eds.)].
- Jungers J.M., DeHaan L.R., Betts K.J., Sheaffer C.C., Wyse D.L. Intermediate wheatgrass grain and forage yield responses to nitrogen fertilization. *Agron. J.* 2017;109(2):462-472. DOI 10.2134/agronj2016.07.0438.
- Jungers J.M., DeHaan L.R., Mulla D.J., Sheaffer C.C., Wyse D.L. Reduced nitrate leaching in a perennial grain crop compared to maize in the Upper Midwest, USA. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2019;272(2):63-73. DOI 10.1016/j.agee.2018.11.007.
- Kantarski T., Larson S., Zhang X., DeHaan L., Borevitz J., Anderson J., Poland J. Development of the first consensus genetic map of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) using genotyping-by-sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 2017;130(1):137-150. DOI 10.1007/s00122-016-2799-7.
- Klimushina M.V., Kroupin P.Yu., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Divashuk M.G. Waxy gene-orthologs in wheat *Thinopyrum* amphidiploids. *Agronomy*. 2020;10(7):963. DOI 10.3390/agronomy10070963.
- Kocheshkova A.A., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G.I., Pochtovy A.A., Upelnik V.P., Belov V.I., Divashuk M.G. Pre-harvest sprouting resistance and haplotype variation of *ThVp-1* gene in the collection of wheat-wheatgrass hybrid. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188049. DOI 10.1371/journal.pone.0188049.
- Lanker M., Bell M., Picasso V.D. Farmer perspectives and experiences introducing the novel perennial grain Kernza intermediate wheatgrass in the US Midwest. *Renew. Agric. Food Syst.* 2020;35(6):653-662. DOI 10.1017/S1742170519000310.
- Larson S., DeHaan L., Poland J., Zhang X., Dorn K., Kantarski T., Anderson J., Schmutz J., Grimwood J., Jenkins J., Shu S., Crain J., Robbins M., Jensen K. Genome mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling domestication traits of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *Theor. Appl. Genet.* 2019;132(6):2325-2351. DOI 10.1007/s00122-019-03357-6.
- Li G.R., Liu C., Li C.H., Zhao J.M., Zhou L., Dai G., Yang E.N., Yang Z.J. Introgression of a novel *Thinopyrum intermedium* St-chromosome-specific HMW-GS gene into wheat. *Mol. Breed.* 2013;31(2):843-853. DOI 10.1007/s11032-013-9838-8.
- Li G., Wang H., Lang T., Li J., La S., Yang E., Yang Z. New molecular markers and cytogenetic probes enable chromosome identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* introgression lines for improving protein and gluten contents. *Planta*. 2016;244(6):865-876. DOI 10.1007/s00425-016-2554-y.
- Mahelka V., Kopecky D., Pastova L. On the genome constitution and evolution of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*: Poaceae, Triticeae). *BMC Evol. Biol.* 2011;11(1):127. DOI 10.1186/1471-2148-11-127.
- Marti A., Bock J.E., Pagani M.A., Ismail B., Seetharaman K. Structural characterization of proteins in wheat flour doughs enriched with intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) flour. *Food Chem.* 2016;194(3):994-1002. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.08.082.
- Marti A., Qiu X., Schoenfuss T.C., Seetharaman K. Characteristics of perennial wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) and refined wheat flour blends: impact on rheological properties. *Cereal. Chem.* 2015;92(5):434-440. DOI 10.1094/CCHEM-01-15-0017-R.
- Nikitina E., Kuznetsova V., Kroupin P., Karlov G.I., Divashuk M.G. Development of specific *Thinopyrum* cytogenetic markers for wheat-wheatgrass hybrids using sequencing and qPCR data. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(12):4495. DOI 10.3390/ijms21124495.
- Pugliese J.Y., Culman S.W., Sprunger C.D. Harvesting forage of the perennial grain crop Kernza (*Thinopyrum intermedium*) increases root biomass and soil nitrogen cycling. *Plant Soil*. 2019;437(2):241-254. DOI 10.1007/s11104-019-03974-6.
- Qiao L., Liu S., Li J., Li S., Yu Z., Liu C., Li X., Liu J., Ren Y., Zhang P., Zhang X., Yang Z., Chang Z. Development of sequence-tagged site marker set for identification of J, J^S, and St sub-genomes of *Thinopyrum intermedium* in wheat background. *Front. Plant Sci.* 2021;12(6):685216. DOI 10.3389/fpls.2021.685216.
- Rahardjo C.P., Gajadeera C.S., Simsek S., Annor G., Schoenfuss T.C., Marti A., Ismail B.P. Chemical characterization, functionality, and baking quality of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*). *J. Cereal Sci.* 2018;83(9):266-274. DOI 10.1016/j.jcs.2018.09.002.
- Ryan M.R., Crews T., Culman S., DeHaan L.R., Jungers J.M., Bakker M. Managing for multifunctionality in perennial grain crops. *Bioscience*. 2018;68(4):294-304. DOI 10.1093/BIOSCI/BIY014.
- Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. *Euphytica*. 2015;201(3):91-101. DOI 10.1007/s10681_014_1344_5.
- Schipanski M.E., MacDonald G.K., Rosenzweig S., Chappell M.J., Bennett E.M., Kerr R.B., Blesh J., Crews T., Drinkwater L., Lundgren J.G. Realizing resilient food systems. *Bioscience*. 2016;66(7):600-610. DOI 10.1093/biosci/biw052.
- Springmann M., Clark M., Mason-D'Croz D., Wiebe K., Bodirsky B.L., Lassaletta L., de Vries W., Vermeulen S.J., Herrero M., Carlson K.M., Jonell M., Troell M., DeClerck F., Gordon L.J., Zurayk R., Scarborough P., Rayner M., Loken B., Fanzo J., Godfray H.C.J., Tilman D., Rockström J., Willett W. Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature*. 2018;562(10):519-525. DOI 10.1038/s41586-018-0591-0.

- Stavridou E., Hastings A., Webster R.J., Robson P.R. The impact of soil salinity on the yield, composition and physiology of the bioenergy grass *Miscanthus × giganteus*. *Glob. Chang. Biol. Bioenergy*. 2016;9(2):92-104. DOI 10.1111/gcbb.12351.
- Suneson C., El Sharkawy A., Hall W.E. Progress in 25 years of perennial wheat breeding. *Crop Sci*. 1963;3(5):437-439. DOI 10.2135/cropsci1963.0011183X000300050021x.
- Sutherlin C.E., Brunzell N.A., de Oliveira G., Crews T.E., DeHaan L.R., Vico G. Contrasting physiological and environmental controls of evapotranspiration over Kernza perennial crop, annual crops, and C₄ and mixed C₃/C₄ grasslands. *Sustainability*. 2019;11(6):1640. DOI 10.3390/su11061640.
- Suyker A.E., Verma S.B. Evapotranspiration of irrigated and rainfed maize-soybean cropping systems. *Agric. For. Meteorol.* 2009; 149(3-4):443-452. DOI 10.1016/j.agrformet.2008.09.010.
- Tang C., Han R., Zhao J., Qiao L., Zhang S., Qiao L., Ge C., Zheng J., Zheng X., Liu C. Identification, characterization, and evaluation of novel stripe rust-resistant wheat-*Thinopyrum intermedium* chromosome translocation lines. *Plant Dis*. 2020;104(1):875-881. DOI 10.1094/PDIS-01-19-0001-RE.
- Vico G., Brunzell N.A. Tradeoffs between water requirements and yield stability in annual vs. perennial crops. *Adv. Water Resour.* 2018; 112(2):189-202. DOI 10.1016/j.advwatres.2017.12.014.
- Wagoner P. Perennial grain development: past efforts and potential for the future. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1990;9(5):381-408. DOI 10.1080/07352689009382298.
- Wang H., Cheng S., Shi Y., Zhang S., Yan W., Song W., Yang X., Song Q., Jang B., Qi X., Li X., Friebe B., Zhang Y. Molecular cytogenetic characterization and fusarium head blight resistance of five wheat-*Thinopyrum intermedium* partial amphiploids. *Mol. Cytogenet.* 2021;14(3):15. DOI 10.1186/s13039-021-00536-3.
- Xi W., Tang Z., Tang S., Yang Z., Luo J., Fu S. New ND-FISH-positive oligo probes for identifying *Thinopyrum* chromosomes in wheat backgrounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(8):2031. DOI 10.3390/ijms20082031.
- Yu Z., Wang H., Xu Y., Li Y., Lang T., Yang Z., Li G. Characterization of chromosomal rearrangement in new wheat-*Thinopyrum intermedium* addition lines carrying *Thinopyrum*-specific grain hardness genes. *Agronomy*. 2019;9(1):18. DOI 10.3390/agronomy9010018.
- Zeri M., Hussain M.Z., Anderson-Teixeira K.J., DeLucia E., Bernacchi C.J. Water use efficiency of perennial and annual bioenergy crops in central Illinois. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 2013;118(3):581-589. DOI 10.1002/jgrg.20052.
- Zhang P., Dundas I.S., Xu S.S., Friebe B., McIntosh R.A., Raupp W.J. Chromosome engineering techniques for targeted introgression of rust resistance from wild wheat relatives. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1659:163-172. DOI 10.1007/978-1-4939-7249-4_14.
- Zhang X., Cui C., Bao Y., Wang H., Li X. Molecular cytogenetic characterization of a novel wheat-*Thinopyrum intermedium* introgression line tolerant to phosphorus deficiency. *Crop J.* 2021;9(4):816-822. DOI 10.1016/j.cj.2020.08.014.
- Zhang X., DeHaan L.R., Higgins L., Markowski T.W., Wyse D.L., Anderson J.A. New insights into high-molecular-weight glutenin subunits and subgenomes of the perennial crop *Thinopyrum intermedium* (Triticeae). *J. Cereal Sci.* 2014;59(2):203-210. DOI 10.1016/j.jcs.2014.01.008.
- Zhang X., Larson S.R., Gao L., DeHaan L.R., Fraser M., Sallam A., Kantarski T., Frels K., Poland J., Wyse D., Anderson J.A. Uncovering the genetic architecture of seed weight and size in *Intermediate wheatgrass* through linkage and association mapping. *Plant Genome*. 2017;10(3):1-15. DOI 10.3835/plantgenome2017.03.0022.
- Zhong Y., Mogoginta J., Gayin J., Annor G.A. Structural characterization of intermediate wheatgrass (*Thinopyrum intermedium*) starch. *Cereal Chem.* 2019;96(5):927-936. DOI 10.1002/cche.10196.

ORCID ID

I.V. Pototskaya orcid.org/0000-0003-3574-2875
V.P. Shamanin orcid.org/0000-0003-4767-9957
A.N. Aydarov orcid.org/0000-0003-1031-3417
A.I. Morgounov orcid.org/0000-0001-7082-5655

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-534 от 28.05.2021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.08.2021. После доработки 21.05.2022. Принята к публикации 24.05.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Повышение эффективности клонального микроразмножения картофеля при инокуляции ризосферными бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2

К.Ю. Каргаполова¹, О.В. Ткаченко¹✉, Г.Л. Бурьгин^{1,2}, Н.В. Евсеева², А.А. Широков², Л.Ю. Матора², С.Ю. Щёголев²

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

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

✉ oktkachenko@yandex.ru

Аннотация. Устойчивое развитие сельского хозяйства зависит от обеспечения рынка качественными семенами. Инокуляция растений рост-стимулирующими ризобактериями в культуре *in vitro* может быть использована для повышения эффективности роста и продуктивности микрорастений при получении оздоровленного посадочного материала картофеля. Изучено влияние инокуляции *in vitro* штаммами *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 по отдельности и в консорциуме на микрорастения сортов Невский и Кондор. Оценены морфологические параметры роста растений в культуре *in vitro*, в условиях адаптации *ex vitro*, а также показатели роста и продуктивности растений в грунтовой теплице. На протяжении всего опыта была установлена зависимость эффективности бактериализации от генотипа картофеля, этапа культивирования и состава инокулята. Методом иммунофлуоресцентного анализа показано, что оба штамма бактерий успешно вступают во взаимодействие с клетками растений без антагонистического взаимного влияния. В культуре *in vitro* *A. baldaniorum* Sp245 и консорциум штаммов стимулировали образование корней на микрорастениях обоих сортов и рост побегов сорта Невский. На этапе культивирования *ex vitro* на все ростовые показатели микрорастений сорта Невский положительно влияла инокуляция *O. cytisi* IPA7.2 и консорциум штаммов. При выращивании в теплице в большинстве вариантов инокуляции стимулировался рост побегов обоих сортов. Приживаемость растений сорта Невский в теплице повысилась под действием одновременной коинокуляции в 1.7 раза. Инокуляция микрорастений консорциумом штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 увеличивала количество мини-клубней у сорта Невский в 1.5 раза, а у сорта Кондор – в 3.5 раза. Инокуляция изученными штаммами может быть использована для стимулирования роста микрорастений и повышения урожайности мини-клубней в системе семеноводства картофеля при получении оздоровленного посадочного материала.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L.; *Azospirillum baldaniorum* Sp245; *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2; растительно-микробные ассоциации; клональное микроразмножение; эффективность роста растений; адаптационная способность; *in vitro*; *ex vitro*.

Для цитирования: Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В., Бурьгин Г.Л., Евсеева Н.В., Широков А.А., Матора Л.Ю., Щёголев С.Ю. Повышение эффективности клонального микроразмножения картофеля при инокуляции ризосферными бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(5):422-430. DOI 10.18699/VJGB-22-52

Improving the efficacy of potato clonal micropropagation by inoculation with the rhizosphere bacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2

K.Yu. Kargapolova¹, O.V. Tkachenko¹✉, G.L. Burygin^{1,2}, N.V. Evseeva², A.A. Shirokov², L.Yu. Matora², S.Yu. Shchyogolev²

¹ Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

✉ oktkachenko@yandex.ru

Abstract. Sustainable development of agriculture depends on the provision of quality seeds to the market. Inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria in *in vitro* culture can be used to improve the growth efficacy and performance of microplants. We examined the effect of *in vitro* inoculation of microplants of the cultivars Nevsky and Kondor with the strains *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 separately and in combination. We examined the morphological variables of plant growth in *in vitro* culture and under *ex vitro* adaptation conditions; we also investigated the growth and performance of the plants in the greenhouse. The dependence of the inoculation efficacy on potato genotype, growth stage, and inoculum composition was ascertained throughout the experiment. *In vitro*, *A. baldaniorum* Sp245 alone and in combination with *O. cytisi* IPA7.2 promoted the formation of roots on the microplants of both cultivars and the growth of Nevsky shoots. During plant growth *ex vitro*, all growth

variables of the Nevsky microplants were promoted by *O. cytisi* IPA7.2 alone and in combination with *A. baldaniorum* Sp245. In both cultivars grown in the greenhouse, shoot growth was promoted in most inoculation treatments. The survival ability of the Nevsky microplants in the greenhouse increased 1.7-fold under the effect of simultaneous inoculation. Inoculation of microplants with a combination of *A. baldaniorum* Sp245 and *O. cytisi* IPA7.2 increased the number of Nevsky minitubers 1.5-fold and the number of Kondor minitubers 3.5-fold. Inoculation with the tested strains can be used to promote the growth of microplants and increase the yield of minitubers in potato seed breeding for the production of healthy planting material.

Key words: *Solanum tuberosum* L.; *Azospirillum baldaniorum* Sp245; *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2; plant-microbe associations, clonal micropropagation; plant growth efficacy; adaptability; *in vitro*; *ex vitro*.

For citation: Kargapolova K.Yu., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Evseeva N.V., Shirokov A.A., Matora L.Yu., Shchyogolev S.Yu. Improving the efficacy of potato clonal micropropagation by inoculation with the rhizosphere bacteria *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):422-430. DOI 10.18699/VJGB-22-52

Введение

В семеноводстве многих вегетативно размножаемых культур широко применяются методы клонального микроразмножения *in vitro* (Rajasekharan, Sahijram, 2015). Ризобактерии различных таксономических групп могут быть использованы при клональном микроразмножении разных видов растений (Orlikowska et al., 2017; Soumare et al., 2021). В качестве объектов бактериализации среди травянистых растений преобладают орхидные (Castillo-Pérez et al., 2021), сахарный тростник (Oliveira et al., 2002) и некоторые другие виды (Dias et al., 2009). Были выделены бактериальные штаммы, стимулирующие рост микроклонов картофеля *in vitro*, адаптацию к условиям *ex vitro*, а также продуктивность мини-клубней (Oswald et al., 2010). Решающее значение имеет правильный подбор микроассоциантов (Wang et al., 2016). В предварительных исследованиях нами было показано, что чистые культуры ассоциативных ризобактерий *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 обладают способностью стимулировать рост микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* (Tkachenko et al., 2015; Burygin et al., 2019; Kargapolova et al., 2020).

Некоторые авторы отмечают, что совместная инокуляция растений двумя и более штаммами ризосферных стимулирующих рост растений бактерий (PGPR) может быть более эффективной по сравнению с чистыми культурами (Thomas et al., 2010). При инокуляции консорциумами штаммов важно учитывать совместимость бактериальных культур (Yegorenkova et al., 2016). Ранее нами установлено, что для штаммов с разными свойствами может иметь значение этап инокуляции микрорастений в процессе культивирования *in vitro* (Бурьгин и др., 2018).

Цель данного исследования – оценка эффективности инокуляции микрорастений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сортов Невский и Кондор чистыми культурами и консорциумом штаммов *Azospirillum baldaniorum* Sp245 и *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 для повышения эффективности семеноводства оздоровленного посадочного материала методом клонального микроразмножения.

Материалы и методы

Культивирование микрорастений картофеля в условиях *in vitro*. Использовались микрорастения двух средне-ранних сортов картофеля Невский (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха», Россия) и Кондор (AGRICO U.A., Netherlands) из

in vitro коллекции кафедры «Растениеводство, селекция и генетика» агрономического факультета Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова (г. Саратов), полученные методом вычленения апикальных меристем. Сорта Невский и Кондор в соответствии с Государственным реестром селекционных достижений, допущенных к использованию (<https://reestr.gossortrf.ru/>), рекомендованы для выращивания в Нижневолжской зоне.

Микрочеренки с одним листом и почкой помещали на жидкую питательную среду Мурасиге–Скуга без гормонов (Murashige, Skoog, 1962). Растения в пробирках культивировали 30 сут при температуре 24 °С, влажности воздуха 60 %, освещенности 60 мкМ/(м²·с), длине дня 16 ч. Оценивали морфометрические параметры побегов и корней: длину побега, мм; количество узлов на побеге, шт.; среднюю длину корней, мм; количество корней на побеге, шт.

Инокуляция микрочеренков штаммами бактерий. Использовали два штамма ризосферных бактерий – *A. baldaniorum* Sp245 (Baldani et al., 1983) и *O. cytisi* IPA7.2 (Burygin et al., 2017, 2019) из Коллекции ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов) (<http://collection.ibppm.ru/>). Культуры бактерий выращивали при 35 °С на ротационном шейкере с интенсивностью перемешивания 120 об/мин до конца экспоненциальной фазы (18 ч) в жидкой малатной среде с содержанием компонентов (г/л): Na-малат 5.0; КН₂Р₄ 0.4; NaCl 0.1; MgSO₄ 0.2; FeSO₄·7H₂O 0.02; Na₂MoO₄·2H₂O 0.002; NH₄Cl 1.0, при pH 6.8–7.0 (Döbereiner, Day, 1976). Клетки стерильно осаждали центрифугированием при 3000 г и ресуспендировали в 0.12 М фосфатном буфере (pH 7.2), содержащем (г/л): КН₂Р₄ 0.43; Na₂НРО₄ 1.68; NaCl 7.2. Центрифугирование повторяли дважды в физиологическом растворе с фосфатным буфером. Для инокуляции в пробирки с растениями, содержащими 10 мл среды Мурасиге–Скуга, добавляли 0.1 мл суспензии (10⁸ кл/мл). Итоговая концентрация клеток бактерий в среде составляла 10⁶ кл/мл.

Бактерии вносили по отдельности: *A. baldaniorum* Sp245 – при черенковании микрорастений картофеля (0-е сутки), *O. cytisi* IPA7.2 – на 15-е сутки культивирования микрорастений, а также совместно: одновременно – на 15-е сутки культивирования микрорастений или последовательно – на 0-е сутки при черенковании штамм *A. baldaniorum* Sp245, а затем дополнительно на 15-е сутки штамм

O. cytisi IPA7.2. В контрольном варианте культивировали микрорастения на среде без бактерий.

Выращивание растений картофеля в условиях *ex vitro*. Адаптация микрорастений к условиям *ex vitro* проводилась в сосудах с почвой 20 сут в оранжерее при температуре 24 °С, влажности воздуха 60 %, освещенности 60 мкМ/(м²·с), длине дня 16 ч. Анализировали морфометрические параметры: длину побегов, количество и площадь листьев.

Затем растения высаживали в грунтовую теплицу с покрытием из агроволокна. Схема посадки 0.4×0.4 м. Условия температуры и влажности воздуха в грунтовой теплице не регулировались и зависели от погоды, поэтому были стрессовыми для растений (дневные температуры могли подниматься до 30 °С, а влажность воздуха опускалась ниже 60 %). Полив растений проводили по необходимости, в среднем через каждые 3–5 сут. Через три недели после посадки, а также в начале фазы бутонизации и цветения регистрировали долю выживших растений, высоту растений, количество побегов и листьев на растениях и площадь листьев. Мини-клубни выкапывали после завядания кустов. Подсчитывали количество и массу мини-клубней на растениях, массу и диаметр каждого клубня.

Иммунофлуоресцентный анализ. Идентификацию бактерий на корнях растений проводили на 30-е сутки после инокуляции методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием штаммоспецифичных антител, как описано (Shelud'ko et al., 2010). Контролем служили неинокулированные и инокулированные корни растений, обработанные неспецифическими антителами. Неспецифическую сорбцию антител блокировали 2-часовой инкубацией отрезков корней при комнатной температуре в 0.05 % растворе полиэтиленгликоля (MW 20000) в фосфатном буфере. В качестве первичных антител использовали штаммоспецифичные кроличьи антитела к липополисахаридам *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 (концентрация 50 мкг/мл) и вторичные изотиоцианат тетраметилпроамина (TRITC)-меченые козьи антикроличьи антитела (Abscam, США; концентрация 1 мкг/мл).

Микроскопию инокулированных корней микрорастений проводили с помощью конфокального микроскопа TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» (ИБФРМ РАН, Саратов).

Статистика. Эксперимент был повторен дважды. В каждом эксперименте в каждом варианте опыта использовали три повторности по 10 растений, всего по 30 растений на вариант каждого опыта. Данные всех экспериментов были подвергнуты двухфакторному дисперсионному анализу (ANOVA). Оценка результатов выполнялась для уровня значимости $p = 0.05$. Для проверки нулевой гипотезы вычисляли критерий Фишера (F фактический), затем определяли наименьшую существенную разницу (НСР_{0,05}) между вариантами опыта, а также проводили множественное сравнение частных средних по тесту Дункана. Использовали пакет программ статистических и биометрико-генетических анализов в растениеводстве и селекции растений AGROS (версия 2.09).

Результаты

Влияние бактерий на рост и развитие микроклонов картофеля в условиях *in vitro*

По всем изучаемым признакам, за исключением средней длины корня, в культуре *in vitro* микрорастения сорта Кондор отставали в росте от микрорастений сорта Невский (рис. 1). На длину побега микрорастений картофеля сорта Невский все варианты инокуляции влияли положительно (см. рис. 1, а). Микрорастения, инокулированные только *A. baldaniorum* Sp245, были выше контроля на 18.9 %, и это максимальный показатель среди изучаемых вариантов. Для сорта Кондор все варианты инокуляции оказывали негативный эффект на длину побега, кроме варианта с *A. baldaniorum* Sp245, в котором растения не отличались от контроля.

На признак «количество узлов на побеге» (см. рис. 1, б) у сорта Невский все варианты инокуляции положительно влияли, кроме инокуляции *O. cytisi* IPA7.2, когда длина растений не отличалась от контроля. У микрорастений сорта Невский, инокулированных *A. baldaniorum* Sp245, было на 11.6 % больше узлов, чем в контроле. Микрорастения, коинокулированные последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), имели на 5 % больше узлов на побегах. Микрорастения, коинокулированные одновременно *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), имели на 10.5 % больше узлов. Варианты инокуляции сорта Кондор чистой культурой *A. baldaniorum* Sp245 и последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), были на уровне контроля. Остальные варианты инокуляции отрицательно влияли на количество узлов на микрорастениях сорта Кондор.

У сорта Невский при инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 средняя длина корней увеличивалась на 4 % по сравнению с контролем (см. рис. 1, в), а *O. cytisi* IPA7.2 – на 3.7 %. Однако последовательная коинокуляция *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) негативно влияла на длину корней (на 4.3 % ниже контроля). Для сорта Кондор все варианты инокуляции оказывали отрицательное влияние на длину корней.

По количеству корней (см. рис. 1, г) для обоих сортов выделились варианты с инокуляцией чистой культурой *A. baldaniorum* Sp245 и коинокуляцией последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки). У сортов Невский и Кондор с инокуляцией *A. baldaniorum* Sp245 количество корней увеличилось на 12.5 % по сравнению с контролем. Микрорастения сорта Невский, коинокулированные последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), имели на 6.3 % больше корней, чем в контроле. Сорт Кондор, коинокулированный последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+*O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), оказался на 26.7 % лучше контроля по количеству корней.

Таким образом, инокуляция чистой культурой *A. baldaniorum* Sp245 или консорциумом последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки)+IPA7.2 (15-е сутки) положительно воздействовала на микрорастения сорта Невский. Увеличивалась длина побега, количество узлов на побеге и количество корней при уменьшении их средней длины.

Идентификация бактерий на корнях микрорастений картофеля *in vitro*

Иммунофлуоресцентный анализ корней картофеля сорта Невский с использованием конфокальной микроскопии показал, что оба штамма бактерий успешно вступают во взаимодействие с клетками растений (рис. 2).

Бактерии обоих штаммов обнаруживались на корнях растений как при использовании для инокуляции чистых культур, так и при коинокуляции. Оба штамма сохранялись в вариантах коинокуляции растений, что говорит об отсутствии антогонистического влияния и преимущества какого-либо штамма при взаимодействии с клетками корней картофеля.

Влияние бактерий на адаптацию микрорастений картофеля к условиям *ex vitro*

Приживаемость сформированных *in vitro* микрорастений картофеля в сосудах с почвой в условиях оранжереи (этап *ex vitro*) была высокой (более 80 %) (рис. 3, а). У сорта Невский снижение приживаемости микрорастений на 6 % по сравнению с контролем отмечено только в варианте с инокуляцией чистой культурой *O. cytisi* IPA7.2. У сорта Кондор снижение приживаемости наблюдалось в двух вариантах: на 11 % – при одновременной инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), а также на 14 % – при использовании чистой культуры *O. cytisi* IPA7.2.

В условиях *ex vitro* обнаружено достоверное влияние генотипа на все изучаемые признаки. Сорт Невский формировал более крупные побеги с большим числом крупных листьев (см. рис. 3).

Все варианты инокуляции положительно влияли на длину побега сорта Невский (см. рис. 3, б). В варианте с инокуляцией *A. baldaniorum* Sp245 высота побегов увеличивалась на 14 % по сравнению с контролем; при коинокуляции последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) – на 5 %; при одновременной коинокуляции *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) – на 11.5 %; при инокуляции *O. cytisi* IPA7.2 – на 8 %. У сорта Кондор все варианты инокуляции отрицательно влияли на длину побега (уменьшение на 4–16 %).

По показателю «количество листьев на побеге» (см. рис. 3, в) во всех вариантах опыта сорт Кондор не отличался от контрольных растений. На сорте Невский, напротив, бактериализация во всех вариантах оказала положительное влияние на данный признак, кроме варианта с инокуляцией *A. baldaniorum* Sp245, в котором не установлено достоверных отличий от контроля. Растения сорта Невский, коинокулированные последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), формировали на 10.5 % больше листьев, чем в контроле. В варианте с одновременной коинокуляцией *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) микрорастения образовали на 18.7 % больше листьев, чем в контроле. Растения, инокулированные *O. cytisi* IPA7.2, имели на 19.4 % больше листьев, чем контрольные.

У сорта Кондор по признаку «площадь листовой поверхности» (см. рис. 3, г) все варианты инокуляции не отличались от контроля, кроме одновременной коиноку-

ляции *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки), когда установлен отрицательный эффект – на 36.6 %. На площадь листьев сорта Невский инокуляция *O. cytisi* IPA7.2 и коинокуляция *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2 влияла положительно (в обоих случаях показатель на 60 % больше, чем в контроле). Растения этого сорта, инокулированные *O. cytisi* IPA7.2, имели более крупные листья (на 19 %), чем в контроле.

Таким образом, эффект инокуляции микрорастений в условиях *in vitro* и на этапе адаптации *ex vitro* существенно зависел от генотипа. На сорт Невский положительное влияние по всем исследуемым показателям оказывала инокуляция *O. cytisi* IPA7.2 отдельно или в комплексе с *A. baldaniorum* Sp245. Для сорта Кондор влияние было отрицательным, или растения не отличались от контроля.

Влияние бактерий на рост микрорастений в грунтовой теплице и урожай мини-клубней

Приживаемость растений в грунтовой теплице была существенно ниже, чем в сосудах в контролируемых условиях (рис. 4, а), поскольку факторы среды не контролировались и зависели от окружающей среды. Для сорта Невский приживаемость варьировала от 30 до 64 %, а для сорта Кондор была еще ниже: от 18.33 до 25 %. Установлен достоверный положительный эффект бактериализации растений сорта Невский на приживаемость в грунтовой теплице в вариантах с инокуляцией *O. cytisi* IPA7.2 (в 1.5 раза) отдельно и в комплексе с *A. baldaniorum* Sp245 (в 1.2 и 1.7 раза). Варианты инокуляции микрорастений сорта Кондор не отличались от контроля.

Как и на предыдущих этапах, сорт Кондор достоверно уступал по вегетативной массе сорту Невский. В условиях теплицы обнаружено более выраженное положительное влияние бактериализации, чем на предыдущих этапах культивирования (см. рис. 4). Только в одном варианте с инокуляцией растений сорта Кондор *O. cytisi* IPA7.2 был обнаружен негативный эффект на длину побега – на 11 %. В двух вариантах опыта не установлено достоверного эффекта по сравнению со стандартом: у растений сорта Кондор по длине побегов при инокуляции *A. baldaniorum* Sp245 и по площади листьев при коинокуляции консорциумом последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки). В остальных вариантах наблюдался положительный эффект инокуляции.

По длине побегов (см. рис. 4, б) у сортов Невский и Кондор положительный эффект наблюдался в вариантах с коинокуляцией последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) – на 57.1 и 27.5 % соответственно, и одновременно (на 15-е сутки) – на 60.6 и 13.8 % соответственно.

По количеству листьев (см. рис. 4, в) аналогичный максимальный положительный эффект для обоих сортов наблюдался в варианте с одновременной коинокуляцией *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) – на 80.5 и 51.1 % для сорта Невский и Кондор соответственно.

Увеличение площади листовой поверхности (см. рис. 4, г) по каждому сорту (Невский, Кондор) наблюдалось в большинстве вариантов бактериализации, но макси-

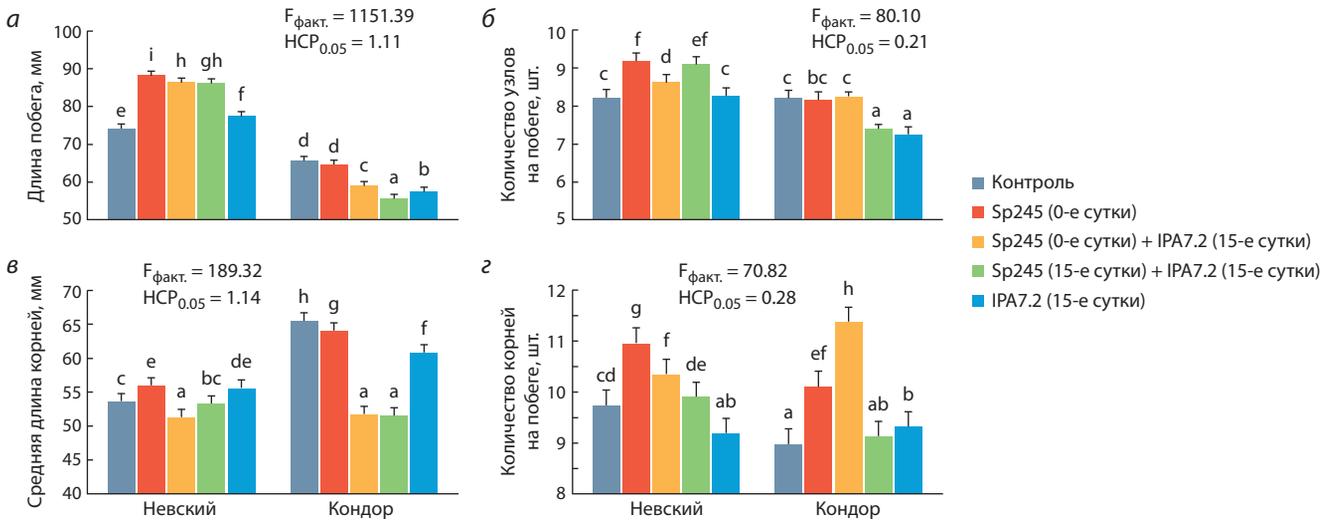


Рис. 1. Влияние инокуляции бактериями *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 в культуре *in vitro* на морфологические параметры микрорастений картофеля: а – длину побега; б – количество узлов на побеге; в – среднюю длину корней; з – количество корней.

Здесь и на рис. 3–5: для всех параметров использован уровень значимости $p = 0.05$, $n = 30$. Разными буквами латинского алфавита (а, б, с и т. д.) показано, что значения вариантов различаются существенно на основании сравнения частных средних по тесту Дункана.

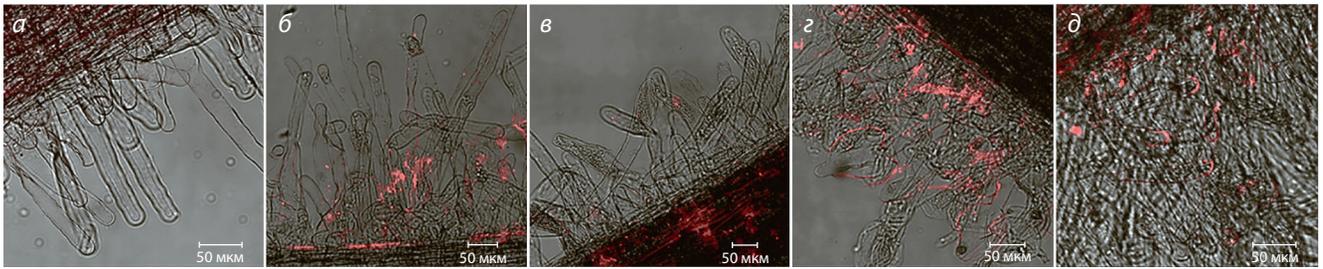


Рис. 2. Идентификация бактерий на корнях микрорастений картофеля с использованием иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии: а – контроль без инокуляции бактериями, антитела к *A. baldaniorum* Sp245 + антитела к *O. cytisi* IPA7.2; б – инокуляция штаммом *A. baldaniorum* Sp245, антитела к *A. baldaniorum* Sp245; в – коинокуляция штаммами *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2, антитела к *A. baldaniorum* Sp245; з – коинокуляция штаммами *A. baldaniorum* Sp245 + *O. cytisi* IPA7.2, антитела к *O. cytisi* IPA7.2; д – инокуляция штаммом *O. cytisi* IPA7.2, антитела к *O. cytisi* IPA7.2.

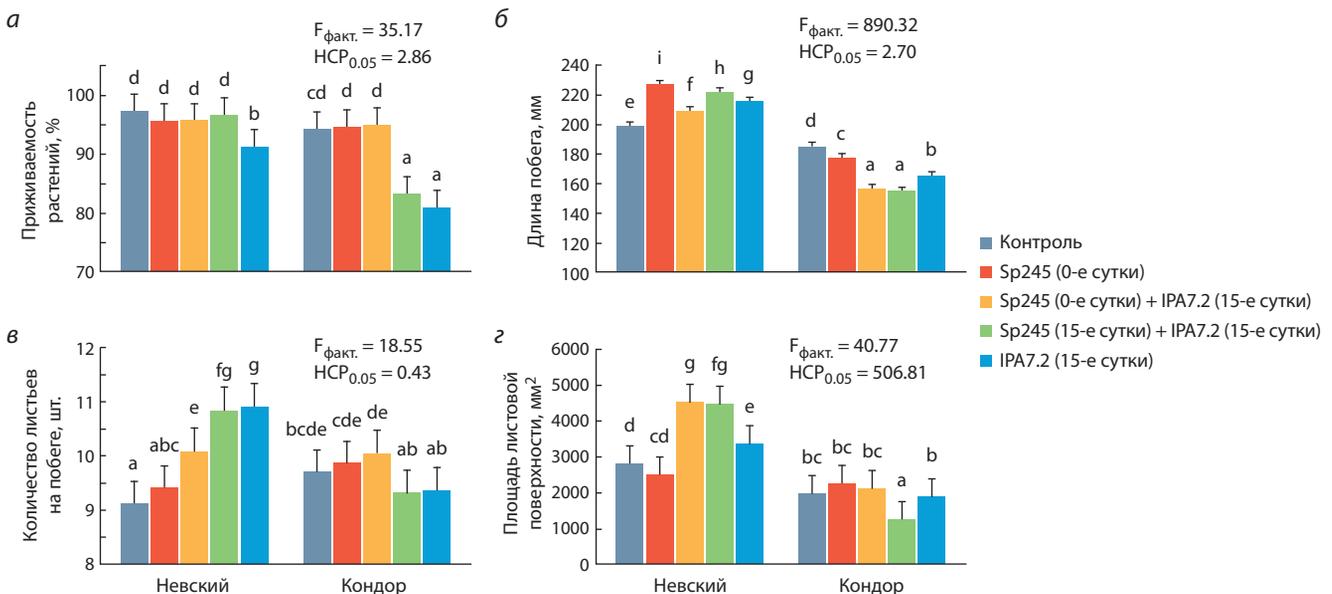


Рис. 3. Влияние инокуляции бактериями *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на этапе адаптации к условиям *ex vitro* на параметры микрорастений картофеля: а – приживаемость растений; б – длину побега; в – количество листьев на побеге; з – площадь листовой поверхности.

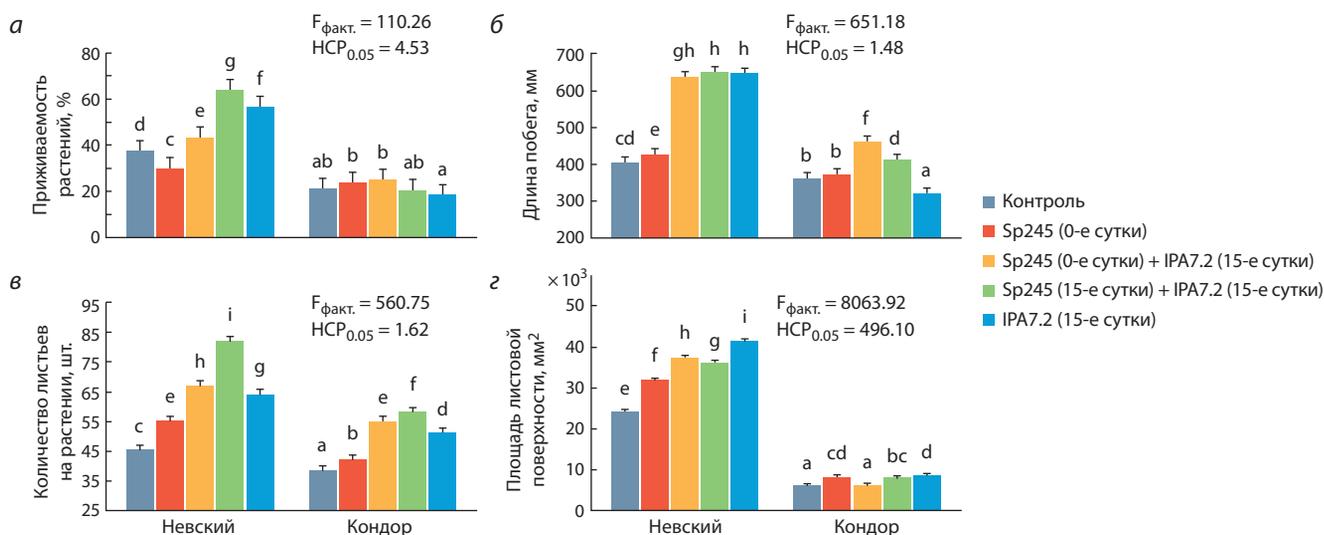


Рис. 4. Влияние инокуляции бактериями *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на параметры микрорастений картофеля в условиях выращивания в грунтовой теплице: а – приживаемость растений; б – длину побега; в – количество листьев на побеге; з – площадь листовой поверхности.

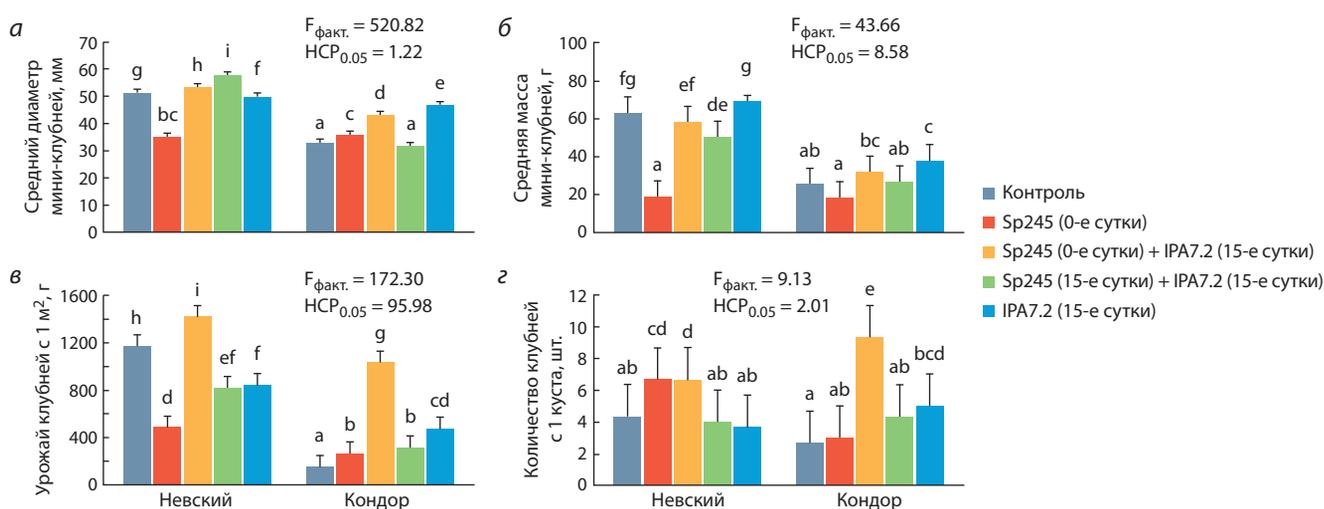


Рис. 5. Влияние инокуляции бактериями *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 на урожай мини-клубней картофеля в условиях выращивания в грунтовой теплице: а – средний диаметр мини-клубней; б – среднюю массу мини-клубней; в – урожай клубней с 1 м²; з – количество клубней с одного растения.

мально – при инокуляции *O. cytisi* IPA7.2 (на 71.0 и 41.0 % соответственно).

По размеру клубней максимальный положительный эффект обнаружен в вариантах с инокуляцией растений *O. cytisi* IPA7.2 (на сорте Кондор) и с коинокуляцией консорциумом последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) (на обоих сортах) (рис. 5, а, б). У сорта Кондор диаметр мини-клубней максимально увеличивался (на 41.9 %) в варианте с инокуляцией *O. cytisi* IPA7.2, а у сорта Невский (на 12.5 %) – в варианте с одновременной коинокуляцией *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки).

Масса мини-клубней (см. рис. 5, б) в большинстве вариантов опыта не отличалась от контроля. Негативное влияние на массу клубней у сорта Невский отмечено при

инокуляции штаммом *A. baldaniorum* Sp245 – на 70.5 %, а также при одновременной коинокуляции *A. baldaniorum* Sp245 (15-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) – на 20.5 %. У сорта Кондор наблюдалось увеличение массы клубней на 48.7 % при инокуляции штаммом *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки). *O. cytisi* IPA7.2 положительно влиял на сорт Кондор по всем показателям размера и массы мини-клубней.

Урожайность мини-клубней сорта Кондор была ниже, чем у сорта Невский, что согласуется с морфометрическими показателями всех предыдущих этапов (см. рис. 5, в). При этом у более урожайного сорта Невский бактериализация в меньшей степени повышала урожайность мини-клубней по сравнению с сортом Кондор. Максимальный положительный эффект инокуляции микрорастений на этапе культуры *in vitro* был обнаружен в варианте коинокуля-

ции последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки). Урожайность мини-клубней с 1 м² в данном варианте инокуляции увеличилась у сорта Невский на 11.1 %, у сорта Кондор в 6.8 раза.

С одного растения в данных экспериментах было получено от 2.67 до 9.33 клубня (см. рис. 5, з). По сортам количеству клубней на растении достоверно не различалось. Эффект бактериализации выявлен у сортов Невский и Кондор в варианте с коинокуляцией консорциумом последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) – в 3.5 и 1.5 раза соответственно. У сорта Невский обнаружен аналогичный эффект увеличения количества мини-клубней с одного растения в варианте инокуляции чистой культурой *A. baldaniorum* Sp245. У сорта Кондор количество клубней на растении увеличилось также в варианте инокуляции *O. cytisi* IPA7.2 – в 1.9 раза.

Таким образом, коинокуляция микрорастений на этапе культивирования *in vitro* консорциумом последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки) существенно увеличивала массу и количество мини-клубней, являющихся оздоровленным оригинальным посадочным материалом.

Обсуждение

Получение оздоровленного посадочного материала – важный этап технологии производства картофеля. Обязательным этапом семеноводства картофеля является клональное микроразмножение растений, свободных от всех видов патогенов, методом культивирования апикальных меристем в культуре *in vitro*. Эффективность метода может быть повышена применением ризосферных бактерий. По данным литературных источников, на всех этапах культивирования, в том числе *in vitro* и *in vivo*, наблюдалось положительное влияние бактерий на рост растений. Отмечено также положительное воздействие на адаптационную способность при посадке микрорастений в нестерильные условия *ex vitro* (Oswald et al., 2010; Belimov et al., 2015; Santiago et al., 2017; Soumare et al., 2021).

Наши предыдущие исследования показали, что для стимулирования роста микрорастений картофеля в условиях *in vitro* и *ex vitro* могут быть использованы ассоциативные ризобактерии *A. baldaniorum* Sp245 (Tkachenko et al., 2015) и *O. cytisi* IPA7.2 (Burygin et al., 2019). Способность бактерий рода *Azospirillum* стимулировать рост и продуктивность картофеля, в том числе в системе производства семян, хорошо известна (Naqqash et al., 2016; Kargapolova et al., 2020; Tkachenko et al., 2021). При этом эффективность применения бактерий выше в оптимальных условиях *in vitro*, но снижается на этапе выращивания растений в поле (Bacilio et al., 2017).

Результаты настоящего исследования тоже показывают, что инокуляция чистой культурой *A. baldaniorum* Sp245 по сравнению с остальными вариантами обработки лучше стимулировала рост микрорастений сорта Невский в оптимальных условиях *in vitro*, чем *ex vitro* или в почве в условиях теплицы. Штамм *A. baldaniorum* Sp245 был выделен из корней пшеницы (Baldani et al., 1983; Ferreira et al., 2020) и является модельным для многих исследований. Согласно нашим данным, этот штамм обладает высокой способностью к производству гормона

индолилуксусной кислоты, что объясняет его стимулирующее влияние на корни микрорастений (Kargapolova et al., 2020).

Штамм *O. cytisi* IPA7.2, выделенный нами непосредственно из корней картофеля и являющийся аборигенным для почв Саратовской области, более устойчив к стрессовым воздействиям, чем азоспириллы (Burygin et al., 2017, 2019). Он выдерживает значительные колебания температуры, повышенные содержания соли и гербицидов, что объясняет его способность защищать растения от стресса, в том числе осмотического (Evseeva et al., 2019).

Влияние бактериальной инокуляции на формирование и линейный рост органов растения (побегов, корней) зависит от существующего на данный момент в растении гормонального баланса, определяемого генетическими особенностями, факторами среды и изменениями, которые вызывают в нем конкретные штаммы (Arkhipova et al., 2020). Поэтому при стимуляции роста побега не всегда достигается аналогичный эффект для корней, а действие разных штаммов и на разных генотипах растений может различаться.

Комбинирование разных штаммов, в том числе азоспирилл с другими микросимбионтами, считается перспективным для инокуляции растений благодаря возможному синергетическому эффекту и большей устойчивости многокомпонентной системы (Panahyan-e-Kivi et al., 2016; Trdan et al., 2019; Gavilanes et al., 2020). Но при использовании коинокуляции важное значение имеет совместимость штаммов, их способность сохраняться на растении одновременно и не вызывать антагонистических проявлений (O'Brien, Harrison, 2021). Эффективность бактериализации зависит от генотипа растения, этапа развития, внешних и внутренних условий (Andreote et al., 2010).

В проведенных нами ранее исследованиях установлено (Бурьгин и др., 2018), что этап инокулирования зависит от особенностей используемого штамма. Бактерии *A. baldaniorum* Sp245 не способны к самостоятельному росту на питательной среде для культивирования микрорастений и могут применяться для инокуляции на любом этапе культивирования микрорастений *in vitro*. Бактерии *O. cytisi* IPA7.2 демонстрируют активный рост на питательной среде для культивирования микрорастений и могут применяться для инокуляции только во второй половине пассажа. Поэтому было изучено два варианта коинокуляции микрорастений штаммами *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2: одновременный на 15-е сутки культивирования и последовательный – *A. baldaniorum* Sp245 на 0-е сутки и *O. cytisi* IPA7.2 на 15-е сутки культивирования. Результаты показали, что *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 способны одновременно сохраняться на корнях растений картофеля без антагонистических взаимодействий (см. рис. 2). При этом синергетический эффект наблюдался не во всех вариантах и зависел от этапа культивирования и сорта картофеля. В условиях культуры *in vitro* (см. рис. 1) варианты коинокуляции двумя штаммами по большинству показателей не превышали действие каждого штамма в отдельности, в том числе *A. baldaniorum* Sp245, обладавшего хорошей рост-стимулирующей активностью в отношении микрорастений сорта Невский.

Адаптационная способность микрорастений в благоприятных лабораторных условиях на этапе высадки *ex vitro* (см. рис. 3) под действием коинокуляции двумя штаммами оставалась на уровне контроля или действия штаммов по отдельности. Но в стрессовых условиях грунтовой теплицы, при слабоконтролируемом действии факторов внешней среды защитное влияние бактериализации проявилось с большей силой (см. рис. 4), по крайней мере для сорта Невский. В том числе максимально повысилась (на 71 %) приживаемость растений данного сорта под действием одновременной коинокуляции, что превзошло положительный эффект инокуляции чистой культурой *O. cytisi* IPA7.2 почти на 20 %.

Положительный эффект коинокуляции отмечен для сорта Невский на этапе адаптации *ex vitro* по количеству и площади листьев на растениях (см. рис. 3), при этом по второму показателю наблюдался синергетический эффект. Максимальное стимулирующее влияние бактериализации отмечено в неблагоприятных условиях выращивания в грунтовой теплице (см. рис. 4), что согласуется с данными (Cesari et al., 2019) о повышении толерантности растений к стрессам под действием бактериализации, в том числе коинокуляции консорциумом бактерий с азоспириллами в составе. На показатели роста растений обоих сортов коинокуляция оказывала положительное влияние на уровне или даже выше действия чистой культуры *O. cytisi* IPA7.2.

Эффективность всей технологии производства оздоровленного посадочного материала картофеля в конечном счете зависит от урожая мини-клубней. Надо сказать, что для семеноводства большее значение имеет не столько масса, сколько количество мини-клубней на растениях, так как это определяет коэффициент размножения и скорость тиражирования семян. Эффект бактериализации на получение мини-клубней проявился особенно сильно, причем на обоих сортах (см. рис. 5). Средний размер мини-клубней изменялся незначительно, но количество мини-клубней на растениях существенно возрастало при коинокуляции последовательно *A. baldaniorum* Sp245 (0-е сутки) + *O. cytisi* IPA7.2 (15-е сутки). Она привела к увеличению выхода мини-клубней у сорта Невский в 1.5 раза, а у сорта Кондор в 3.5 раза, причем для сорта Кондор отмечен синергетический эффект коинокуляции по сравнению с действием штаммов по отдельности. Аналогичный синергетический эффект отмечен для обоих сортов в том же варианте коинокуляции по урожаю мини-клубней с 1 м².

Способ коинокуляции – последовательный (при черенковании *A. baldaniorum* Sp245 и затем *O. cytisi* IPA7.2 на 15-е сутки) или одновременный на 15-е сутки – на разных этапах культивирования микрорастений проявлял влияние по-разному, но исходя из стимулирующего эффекта *A. baldaniorum* Sp245 в условиях *in vitro* и конечного получения мини-клубней можно считать предпочтительным последовательную коинокуляцию.

Заключение

По результатам экспериментов установлено положительное влияние бактериальных штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 как по отдельности, так и в составе консорциума, которое по-разному проявлялось на различных этапах культивирования растений. Макси-

мальный положительный эффект бактериализации на этапе культуры *in vitro* установлен по количеству адвентивных корней, на этапе адаптации *ex vitro* – по количеству и площади листьев, при выращивании растений в почве в условиях теплицы – по всем показателям вегетативной части побегов, а также по массе мини-клубней. Между рассмотренными штаммами бактерий не наблюдалось антагонистического влияния. Отмечена существенная зависимость рост-стимулирующего эффекта бактерий от генотипа картофеля. Максимальный положительный эффект при взаимодействии двух штаммов получен на этапе выращивания инокулированных растений в открытом грунте. Использование штаммов *A. baldaniorum* Sp245 и *O. cytisi* IPA7.2 по отдельности и совместно может быть рекомендовано для инокуляции микрорастений картофеля в культуре *in vitro* при клональном микроразмножении картофеля в системе производства оздоровленного посадочного материала для устойчивого развития сельского хозяйства.

Список литературы / References

- Бурьгин Г.Л., Каргаполова К.Ю., Евсеева Н.В., Ткаченко О.В. Особенности инокуляции растений ризосферными бактериями как фактор повышения эффективности микроклонального размножения картофеля. *Вестн. биотехнологии и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2018;14(2):12-16.
- [Burygin G.L., Kargapolova K.Y., Evseeva N.V., Tkachenko O.V. Peculiarities of plant inoculation with rhizosphere bacteria as a factor increasing the efficacy of potato microclonal propagation. *Vestnik Biotehnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova = Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2018;14(2):12-16. (in Russian)]
- Andreote F.D., Rocha U.N., Araújo W.L., Azevedo J.L., van Overbeek L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie Leeuwenhoek*. 2010; 97(4):389-399. DOI 10.1007/s10482-010-9421-9.
- Arkhipova T.N., Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Vysotskaya L.B., Akhtyamova Z.A., Kudoyarova G.R. Rhizobacteria inoculation effects on phytohormone status of potato microclones cultivated *in vitro* under osmotic stress. *Biomolecules*. 2020;10(9): 1231. DOI 10.3390/biom10091231.
- Bacilio M., Moreno M., Lopez-Aguilar D.R., Bashan Y. Scaling from the growth chamber to the greenhouse to the field: demonstration of diminishing effects of mitigation of salinity in peppers inoculated with plant growth-promoting bacterium and humic acids. *Appl. Soil Ecol.* 2017;119:327-338. DOI 10.1016/j.apsoil.2017.07.002.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* 1983;29(8):924-929. DOI 10.1139/m83-148.
- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Shaposhnikov A.I., Azarova T.S., Makarova N.M., Davies W.J., Tikhonovich I.A. Rhizobacteria that produce auxins and contain 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid deaminase decrease amino acid concentrations in the rhizosphere and improve growth and yield of well-watered and water-limited potato (*Solanum tuberosum*). *Ann. Appl. Biol.* 2015; 167(1):11-25. DOI 10.1111/aab.12203.
- Burygin G.L., Kargapolova K.Y., Kryuchkova Y.V., Avdeeva E.S., Gogoleva N.E., Ponomaryova T.S., Tkachenko O.V. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019;35(4):55. DOI 10.1007/s11274-019-2633-x.
- Burygin G.L., Popova I.A., Kargapolova K.Y., Tkachenko O.V., Matora L.Y., Shchyogolev S.Y. A bacterial isolate from the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.) identified as *Ochrobactrum lu-*

- pini* IPA7.2. *Agric. Biol.* 2017;52(1):105-115. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.105eng.
- Castillo-Pérez L.J., Martínez-Soto D., Fortanelli-Martínez J., Carranza-Álvarez C. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2021;146:249-257. DOI 10.1007/s11240-021-02064-9.
- Cesari A.B., Paulucci N.S., López-Gómez M., Hidalgo-Castellanos J., Plá C.L., Dardanelli M.S. Performance of *Bradyrhizobium* and *Bradyrhizobium-Azospirillum* in alleviating the effects of water-restrictive conditions during the early stages of *Arachis hypogaea* growth. *J. Plant Growth Regul.* 2019;38:1362-1374. DOI 10.1007/s00344-019-09939-4.
- Dias A.C.F., Costa F.E.C., Andreote F.D., Lacava P.T., Teixeira M.A., Assumpção L.C., Araújo W.L., Azevedo J.L., Melo I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009;25:189-195. DOI 10.1007/s11274-008-9878-0.
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: Proceedings of the 1st Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Washington State Univ., 1976;518-538.
- Evseeva N.V., Tkachenko O.V., Denisova A.Y., Burygin G.L., Veselov D.S., Matora L.Y., Shchyogolev S.Y. Functioning of plant-bacterial associations under osmotic stress in vitro. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019;35:195. DOI 10.1007/s11274-019-2778-7.
- Ferreira N.D.S., Sant'Anna F.H., Reis V.M., Ambrosini A., Volpiano C.G., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.O., Passaglia L.M.P., de Souza E.M., Hartmann A., Casan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70(12):6203-6212. DOI 10.1099/ijsem.0.004517.
- Gavilanes F.Z., Andrade D.S., Zucareli C., Horácio E.H., Yunes J.S., Barbosa A.P., Alves L.A.R., Cruzatty L.G., Maddela N.R., Guimarães M.F. Co-inoculation of *Anabaena cylindrica* with *Azospirillum brasilense* increases grain yield of maize hybrids. *Rhizosphere.* 2020;15:100224. DOI 10.1016/j.rhisph.2020.100224.
- Kargapolova K.Y., Burygin G.L., Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Pukhalskiy Y.V., Belimov A.A. Effectiveness of inoculation of in vitro-grown potato microplants with rhizosphere bacteria of the genus *Azospirillum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2020;141:351-359. DOI 10.1007/s11240-020-01791-9.
- Murashige T., Skoog G. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15(3):473-497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Naqqash T., Hameed S., Imran A., Hanif M.K., Majeed A., van Elsas J.D. Differential response of potato toward inoculation with taxonomically diverse plant growth promoting rhizobacteria. *Front. Plant Sci.* 2016;7:144. DOI 10.3389/fpls.2016.00144.
- O'Brien A.M., Harrison T.L. Host match improves root microbiome growth. *Nat. Microbiol.* 2021;6(9):1103-1104. DOI 10.1038/s41564-021-00957-1.
- Oliveira A.L.M., Urquiaga S., Döbereiner J., Baldani J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil.* 2002;242:205-215. DOI 10.1023/A:1016249704336.
- Orlikowska T., Nowak K., Reed B. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2017;128:487-508. DOI 10.1007/s11240-016-1144-9.
- Oswald A., Calvo V.P., Davila D.Z., Pineda J.A. Evaluating soil rhizobacteria for their ability to enhance plant growth and tuber yield in potato. *Ann. Appl. Biol.* 2010;157(2):259-271. DOI 10.1111/j.1744-7348.2010.00421.x.
- Panahyan-e-Kivi M., Raei Y., Hassanpanah D. Study the effect of growth promoting bacteria (GPRB) on number and weight of mini-tubers of *Solanum tuberosum* cultivars in greenhouse conditions. *J. Fundam. Appl. Sci.* 2016;8(2S):28-38. DOI 10.4314/jfas.v8i2s.556.
- Rajasekharan P.E., Sahjram L. Plant biology and biotechnology. In: Plant Biology and Biotechnology. Vol. II. Plant genomics and biotechnology. New Delhi: Springer, 2015:417-443. DOI 10.1007/978-81-322-2283-5_30.
- Santiago C.D., Yagi S., Ijima M., Nashimoto T., Sawada M., Ikeda S., Asano K., Orikasa Y., Ohwada T. Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. *Microbes Environ.* 2017;32(1):14-23. DOI 10.1264/jsm.2ME16127.
- Shelud'ko A.V., Shirokov A.A., Sokolova M.K., Sokolov O.I., Petrova L.P., Matora L.Y., Katsy E.I. Wheat root colonization by *Azospirillum brasilense* strains with different motility. *Microbiology.* 2010;79(5):688-695. DOI 10.1134/S0026261710050140.
- Soumare A., Diédhiou A.G., Arora N.K., Al-Ani L.K.T., Ngom M., Fall S., Hafidi M., Ouhdouch Y., Koussini L., Sy M.O. Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Front. Microbiol.* 2021;12:649878. DOI 10.3389/fmicb.2021.649878.
- Thomas J., Ajay D., Kumar R.R., Mandal A.K.A. Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;101:365-370. DOI 10.1007/s11240-010-9687-7.
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum*. *Agron. Sustain. Develop.* 2015;35:1167-1174. DOI 10.1007/s13593-015-0304-3.
- Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Terentyeva E.V., Burygin G.L., Shirokov A.A., Burov A.M., Matora L.Y., Shchyogolev S.Y. Improved production of high-quality potato seeds in aeroponics with plant-growth-promoting rhizobacteria. *Potato Res.* 2021;64:55-66. DOI 10.1007/s11540-020-09464-y.
- Trdan S., Vučajnik F., Bohinc T., Vidrih M. The effect of a mixture of two plant growth-promoting bacteria from Argentina on the yield of potato, and occurrence of primary potato diseases and pest – short communication. *Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci.* 2019;69(1):89-94. DOI 10.1080/09064710.2018.1492628.
- Wang X., Yam T., Meng Q., Zhu J., Zhang P., Wu H., Wang J., Zhao Y., Song X. The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under in vitro culture conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016;126(3):523-531. DOI 10.1007/s11240-016-1021-6.
- Yegorenkova I.V., Tregubova K.V., Burygin G.L., Matora L.Y., Ignatov V.V. Assessing the efficacy of co-inoculation of wheat seedlings with the associative bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1465 and *Azospirillum brasilense* Sp245. *Can. J. Microbiol.* 2016;62(3):279-285. DOI 10.1139/cjm-2015-0647.

ORCID ID

K.Yu. Kargapolova orcid.org/0000-0002-6040-9401
O.V. Tkachenko orcid.org/0000-0001-8327-6763
G.L. Burygin orcid.org/0000-0001-8031-9641

N.V. Evseeva orcid.org/0000-0002-3973-6766
A.A. Shirokov orcid.org/0000-0003-4321-735X
L.Yu. Matora orcid.org/0000-0001-5654-8292
S.Yu. Shchyogolev orcid.org/0000-0002-1084-312X

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-016-00116.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 12.11.2021. После доработки 10.03.2022. Принята к публикации 28.04.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные

А.Л. Левинсон^{1,3}, Т.Н. Игонина², И.Н. Рожкова², Е.Ю. Брусенцев², С.Я. Амстиславский^{2,3} 

¹ Новосибирский центр репродуктивной медицины, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 amstis@yandex.ru

Аннотация. Темп современной жизни, уровень шума, плотность населения, особенно в больших городах, нарушение ритма сна и отдыха, количество получаемой и обрабатываемой разнонаправленной информации и другие факторы современной жизни в мегаполисах могут приводить к хроническому психоэмоциональному стрессу. Все чаще в публикациях последних лет появляется понятие «синдром мегаполиса», объединяющее нарушения сна, проявления тревожности и изменение репродуктивной функции. Медицинские процедуры также считаются стрессовыми факторами; более того, само состояние бесплодия, как и его лечение, нередко является затяжным, длится годами, что в свою очередь способствует субадаптивным и неадаптивным реакциям организма, усугубляющим проблему. Пребывание в состоянии дистресса может отражаться на состоянии здоровья в целом и на реализации репродуктивной функции в частности. В обзоре обсуждаются литературные сведения, касающиеся влияния стресса матери на фолликулогенез, в том числе на фоне применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Сопоставлены клинические данные и результаты экспериментальных исследований на лабораторных животных о влиянии психоэмоционального стресса до и во время беременности на созревание ооцитов и развитие эмбрионов. Особое внимание уделено влиянию психоэмоционального стресса на репродуктивную функцию на фоне применения ВРТ, когда введение экзогенных гормонов компенсирует вызванное стрессом нарушение функции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси. При применении ВРТ стресс-индуцированное нарушение оогенеза реализуется не через путь снижения выработки гормонов гипоталамуса и гипофиза, а через другие механизмы, в частности паракринные, которые описаны в этом обзоре. В результате проведенного анализа литературы можно сделать заключение о том, что стресс негативно влияет на развитие ооцитов яичника, а также последующее развитие полученных из них эмбрионов, выявлена роль некоторых паракринных факторов яичника, таких как BDNF, GDF-9, HB-EGF, TNF- α и др., которые задействованы в этих процессах.

Ключевые слова: стресс; отдаленные эффекты; фолликулогенез; вспомогательные репродуктивные технологии; преимплантационный эмбрион.

Для цитирования: Левинсон А.Л., Игонина Т.Н., Рожкова И.Н., Брусенцев Е.Ю., Амстиславский С.Я. Психоэмоциональный стресс, фолликулогенез и репродуктивные технологии: клинические и экспериментальные данные. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):431-441. DOI 10.18699/VJGB-22-53

Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data

A.L. Levinson^{1,3}, T.N. Igonina², I.N. Rozhkova², E.Yu. Brusentsev², S.Ya. Amstislavsky^{2,3} 

¹ Novosibirsk Center of Reproductive Medicine, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 amstis@yandex.ru

Abstract. Modern life, especially in large cities, exposes people to a high level of noise, high density of population, disrupted sleeping, large amount of excessive and controversial information as well as to other negative factors; all this may cause chronic psycho-emotional stress. The latest publications often use the term "Syndrome of megapolopolis", which means disruption of sleeping, high anxiety, and altered reproductive function. Medical treatment of infertility may also be considered as a stress factor, especially when infertility lasts for years and is aggravated with emotional frustration. Long-lasting distress may worsen health in general and suppress reproductive function, in particular. The review presents the data on the effects of maternal stress on folliculogenesis, especially when assisted reproductive technologies (ARTs) are used. Clinical data are presented alongside data from laboratory animal experiments. Different maternal stress models are taken into account in respect of their influence on oocyte maturation and embryo development. The interfering of psycho-emotional stress and reproductive function is the focus of the

review. In these situations, exogenous hormones compensate for the stress-related disruption of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. When ARTs are implemented, stress-induced disruption of oogenesis is realized not via a decrease in hypothalamic and pituitary hormones, but by other ways, which involve paracrine mechanisms described in this review. Based on the literature analysis, one may conclude that stress negatively affects oocyte maturation in the ovary and suppresses subsequent embryo development. The role of some ovarian paracrine factors, such as BDNF, GDF-9, HB-EGF, TNF- α , and some others has been elucidated.

Key words: stress; long-term effects; folliculogenesis; assisted reproductive technologies; preimplantation embryo.

For citation: Levinson A.L., Igonina T.N., Rozhkova I.N., Brusentsev E.Yu., Amstislavsky S.Ya. Psycho-emotional stress, folliculogenesis, and reproductive technologies: clinical and experimental data. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):431-441. DOI 10.18699/VJGB-22-53

Введение

Репродуктивная функция взрослых и здоровье детей являются неизменно актуальной областью научного интереса и здравоохранения. Внедрение в клиническую практику вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) помогает преодолеть многие виды бесплодия, невынашивания беременности, а также предотвратить моногенные заболевания у детей. В то же время пациенты ВРТ-клиник часто сообщают о бесплодии и его лечении как об одном из самых сильных переживаний в своей жизни, что иногда приводит к развитию тревожных и даже депрессивных состояний (Cousineau, Domar, 2007; Rockliff et al., 2014). Таким образом, хронический психоэмоциональный стресс, действующий как на женщину, так и на мужчину при лечении бесплодия, особенно с помощью ВРТ, считается существенным фактором, оказывающим влияние на фертильность.

Существует множество свидетельств негативного влияния хронического стресса на организм человека и других млекопитающих в целом и на репродуктивную функцию в частности (Louis et al., 2011; Muscatell, Eisenberger, 2012). Описано влияние стресса во время беременности на массу тела новорожденных и формирование нервной системы у детей; имеются также многочисленные данные о воздействии пренатального стресса на поведение и другие фенотипические характеристики различных животных (Weinstock, 2008, 2016; Пагаева и др., 2018; Fitzgerald et al., 2021).

Несмотря на то что исследования последствий психоэмоционального стресса широко представлены как в медицинской, так и в научной биологической литературе, посвященной экспериментам на лабораторных моделях, эти два направления развиваются во многом независимо. Более того, в связи с бурным развитием и широким внедрением в практику вспомогательных репродуктивных технологий все чаще встает вопрос о том, каким образом и посредством каких механизмов психоэмоциональный стресс, в том числе и стресс, возникающий при применении ВРТ, может повлиять на репродуктивные исходы. Задачей обзора как раз является попытка понять и систематизировать накопившиеся к настоящему времени экспериментальные и клинические данные о влиянии хронического психоэмоционального стресса на гаметогенез, фертильность, исходы ВРТ и здоровье потомства; охарактеризовать варианты животных моделей, используемых в экспериментах, и наметить возможные пути смягчения неблагоприятных эффектов стресса при применении ВРТ. При этом экспериментальные данные, по-

лученные на животных моделях, сопоставлены с клиническими наблюдениями, опубликованными в литературе. Влияние стресса на фолликуло- и эмбриогенез, а также на потомков, как у людей, так и у экспериментальных животных, анализируются в контексте применения ВРТ.

Моделирование психоэмоционального стресса на лабораторных животных

В экспериментальных работах, направленных на исследование влияния хронического психоэмоционального стресса на развитие ооцитов и ранних эмбрионов, в том числе на фоне применения репродуктивных технологий, чаще всего используют такие модели, как рестрикционный стресс (Burkus et al., 2013; Gao et al., 2016), присутствие хищника (Liu et al., 2012; Di Natale et al., 2019) или модель хронического непредсказуемого стресса (CUMS) (Wu L.M. et al., 2012a, b; Gao et al., 2016). В качестве индикаторов стресса измеряют уровень кортикостероидов, АКТГ, кортикотропин-рилизинг гормона, адреналина, норадреналина, грелина в плазме крови; реже – стресс-вызванную анальгезию, поведенческие характеристики в тестах.

Рестрикционная модель стресса заключается в ограничении подвижности животных (Gao et al., 2016). Для этих целей могут использоваться ленты, гипс, тканевое полотно или другие средства, с помощью которых фиксируют конечности в неподвижном состоянии, так что только голова может двигаться свободно; чаще всего это пластиковая или металлическая трубка либо специальная микроклетка (Zhang et al., 2011; Gao et al., 2016). Помимо самих приспособлений, в рестрикционной модели на интенсивность стрессовой реакции влияет также продолжительность процедуры и количество эпизодов ограничений (Zhang et al., 2011; Wu X.F. et al., 2015; Zhao X.Y. et al., 2020).

Для моделирования психогенного стресса у грызунов используют их естественных хищников – кошек, хорьков, крыс или лисиц, присутствие и запах которых вызывают реакции страха и тревоги (Sanchez-Gonzalez et al., 2018; Di Natale et al., 2019). Наиболее часто применяемым вариантом этой модели хронического стресса по отношению к мышам является предъявление голодного кота или его запаха без физического контакта с ним (Liu et al., 2012). При этом воздействие хищника происходит через зрительные, обонятельные и звуковые стимулы. У стрессуемых животных происходит активация гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной оси, что повышает секрецию глюкокортикоидов (Sanchez-Gonzalez et al., 2018).

Другая широко используемая модель стресса – хронический непредсказуемый стресс. В рамках данной модели грызунам предъявляют постоянно меняющиеся различные стрессоры на протяжении нескольких недель. Эта схема предотвращает процесс адаптации к стрессу, который наблюдается в других моделях хронического стресса (Campos et al., 2013). В качестве стрессоров могут применяться чередование изоляции и скученности, а также смена таких воздействий, как изменение условий домашней клетки – влажные опилки, наклон клетки под углом, нарушение цикла день–ночь, воздействие различной температурой, ограничение подвижности, социальный стресс (Haller et al., 1999; Gao et al., 2016; Burstein, Doron, 2018; Gadek-Michalska et al., 2019). После нескольких дней такого режима животные демонстрируют повышение уровня кортикостерона в крови и сниженный ответ на приятные стимулы (Campos et al., 2013; Gadek-Michalska et al., 2019).

Влияние стресса на репродуктивную функцию самок млекопитающих: экспериментальные данные

Исследования на различных животных моделях показывают, что психоэмоциональный стресс, которому подвергается самка, влияет на количество и качество ее ооцитов, что в свою очередь вносит вклад в дальнейшее эмбриональное развитие (см. таблицу). Авторы многих работ приходят к выводу о том, что стресс снижает потенциал развития ооцитов (Wiebold et al., 1986; Zhang et al., 2011; Liu et al., 2012; Lian et al., 2013; Wu X.F. et al., 2015; Gao et al., 2016), который проявляется в сниженной доле развившихся из этих ооцитов blastocyst и меньшем числе клеток в blastocystах. Кроме того, снижение потенциала развития ооцитов было связано с длительностью и тяжестью примененного стрессового воздействия (Gao et al., 2016). Также показано, что антральные фолликулы более чувствительны к стрессу, чем преантральные (Gao et al., 2016). Более того, хронический непредсказуемый стресс может приводить к ановуляции и ацикличности у самок мышей, что коррелирует с высоким уровнем кортикостероидов в крови и повышенной активностью супероксиддисмутазы, а после стимуляции суперовуляции у стрессированных самок не обнаруживались зрелые ооциты (Kala, Nivsarkar, 2016).

Стресс может оказывать влияние и на имплантацию эмбрионов. Так, даже короткий рестрикционный стресс длительностью 24 ч, но по времени совпадающий с «окном имплантации», т. е. с четвертым днем после спаривания, оказывает угнетающее воздействие на уровень имплантации у мышей и замедляет наступление хэтчинга у blastocyst (Zhao L.H. et al., 2013). Как показано в этой работе, эффект был опосредован через снижение уровней прогестерона и эстрадиола, а также уровня экспрессии гепарин-связывающего эпидермального фактора роста как в эндометрии, так и в самих blastocystах (Zhao L.H. et al., 2013).

Известно, что стресс приводит к возбуждению гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем. Соответственно, традиционными маркерами стресса являются глюкокортикоиды и адреналин. Показано, что у мышей рестрикционный стресс сопровож-

дался возрастанием уровня кортизола в плазме крови (Zhang et al., 2011). Инъекции кортизола тоже приводили к ухудшению потенциала развития ооцитов. Помимо этого, стресс способствовал снижению высвобождения фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тогда как инъекции кортизола такого эффекта не вызывали. Исследователи пришли к выводу, что кортизол повреждает ооциты через прямое воздействие на яичник, тогда как стресс ухудшает их компетентность опосредованно, воздействуя на гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую и гипоталамо-гипофизарно-яичниковую оси (Zhang et al., 2011).

Одним из путей реализации стрессового воздействия на репродуктивную функцию является влияние на выработку овариальных регуляторов фолликулогенеза, в том числе опосредованную кортикотропин-рилизинг гормоном. Кортикотропин-рилизинг гормон, который идентифицируется в теке и строме яичников, а также в цитоплазме ооцитов и гранулезных клеток, участвует в регулировании созревания фолликулов, овуляции, образования желтых тел и синтеза половых гормонов в яичниках (Kiapekou et al., 2010; Zhai et al., 2020).

У самок мышей рестрикционный стресс вызывал повышение уровня кортикотропин-рилизинг гормона в сыворотке крови, яичниках и ооцитах, а также увеличение экспрессии рецептора кортикотропин-рилизинг гормона первого подтипа (КРГР1) в гранулезных клетках и клетках теки и снижение экспрессии глюкокортикоидного рецептора и нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в яичниках (Liang et al., 2013). Все это в итоге приводило к дисбалансу между эстрадиолом и прогестероном и снижению компетентности ооцитов. Кроме того, добавление кортикотропин-рилизинг гормона к среде для дозревания ооцитов *in vitro* нарушало их потенциал развития и увеличивало апоптоз в гранулезных клетках (Liang et al., 2013). В другой работе было показано, что вызванное стрессом повышение уровня этого гормона как в крови, так и непосредственно в яичниках у самок мышей запускает апоптоз в ооцитах и гранулезных клетках яичников за счет активации TNF- α системы, что в результате приводит к нарушению компетентности ооцитов (Zhao X.Y. et al., 2020).

На модели хронического непредсказуемого стресса продемонстрировано, что ингибирование развития фолликулов связано не только с гонадотропинами, но и с такими ростовыми факторами, как фактор роста и дифференцировки (growth differentiation factor 9, GDF-9) и нейротрофический фактор мозга (BDNF) (Wu L.M. et al., 2012b). У самок мышей хронический непредсказуемый стресс подавлял развитие фолликулов и экспрессию GDF-9, а также увеличивал атрезию фолликулов. Введение экзогенных гонадотропинов позволяло частично восстановить развитие антральных фолликулов, но не оказывало влияния на вторичные фолликулы. Введение рекомбинантного GDF-9 восстанавливало развитие вторичных фолликулов, а совместное применение GDF-9 и гонадотропинов у стрессированных мышей восстанавливало как вторичные, так и антральные фолликулы. В другой работе этой же группы исследователей хронический непредсказуемый стресс снижал экспрессию BDNF в

Эффекты различных видов стресса на развитие ооцитов и эмбрионов у мышей

Модель стрессового воздействия	Время стрессового воздействия	Эффект от стрессового воздействия	Литературный источник
Присутствие хищника	В течение 24 ч после введения исследуемым самкам мышей гонадотропина сыворотки жеребых кобыл	Снижение потенциала развития ооцитов и полученных из них эмбрионов как <i>in vivo</i> , так и <i>in vitro</i>	Liu et al., 2012
Рестрикция	Ежедневно по 8 ч на протяжении 4, или 8, или 15, или 23 дней непосредственно до введения самкам мышей гонадотропина сыворотки жеребых кобыл и за 48 ч до получения у них ранних эмбрионов	Снижение потенциала развития <i>in vitro</i> эмбрионов у мышей, подвергнутых стрессу в течение 8 дней и более	Gao et al., 2016
	В течение 24 ч, на 4-й день беременности мышей (период «окна имплантации»)	Снижение количества сайтов имплантации. Замедление хэтчинга бластоцист. Снижение концентрации прогестерона и эстрадиола в крови и снижение экспрессии HB-EGF* в эндометрии матки и в бластоцистах	Zhao L.H. et al., 2013
	Самки мышей подвергались рестрикции в течение 48 ч непосредственно до начала беременности	Повышение кортикотропин-рилизинг гормона в крови и яичниках. Активация TNF-α** системы. Запуск апоптоза в ооцитах и гранулезных клетках яичников. Нарушение компетентности ооцитов	Zhao X.Y. et al., 2020
	Рестрикция самок мышей 24 ч, 48 ч или 23 дня непосредственно до гормональной стимуляции и извлечения ооцитов	Как 48 ч, так и 23 дня рестрикции сопровождались снижением ацетилирования и метилирования гистонов, что в конечном итоге снижало потенциал развития ооцитов	Wu X.F. et al., 2015
	На протяжении 24 ч, за 16 ч до извлечения ооцитов у самок мышей	Повышение уровня кортикотропин-рилизинг гормона в сыворотке крови, яичниках и ооцитах. Увеличение апоптоза в кумулюсных клетках, приводящее к нарушению компетентности ооцитов	Liang et al., 2013
		Нарушение сборки веретена деления на стадии M1. Увеличение доли анеуплоидии в созревших ооцитах	Zhou et al., 2012
	Накопление активных форм кислорода в сыворотке крови, яичниках и ооцитах. Снижение доли развившихся из этих ооцитов бластоцист и числа клеток в них	Lian et al., 2013	
	В течение 24 и 48 ч в период роста и созревания ооцитов: проэструс у нестимулированных мышей (24 ч), ранняя (0–24 ч) и поздняя (24–48 ч) стадии развития ооцитов у гормонально стимулированных мышей	Нарушение овуляции, угнетение развития полученных из овулировавших ооцитов эмбрионов. Меньшее число живых потомков, рожденных после переноса этих эмбрионов реципиентам, в сравнении с нестрессированным контролем	Zhang et al., 2011
Хронический непредсказуемый стресс	На протяжении четырех дней два раза в день воздействие различными стрессорами на самок мышей: горячий воздух; плавание в воде разной температуры; встряхивание	Повышение процентного соотношения атрезирующих антральных фолликулов; снижение доли 4-клеточных эмбрионов и бластоцист, меньшее число клеток в бластоцистах и меньшее число живых потомков, рожденных после переноса этих эмбрионов	Gao et al., 2016
	На протяжении пяти дней один раз в день (30–60 мин) воздействие различными стрессорами на самок мышей: рестрикция; нахождение в наклоненной клетке или в клетке с грязной подстилкой; изоляция; отсутствие подстилки	Нарушения эстрального цикла. Возрастание атрезирующих антральных фолликулов. Ановуляция. Число ооцитов, извлеченных у стрессированных мышей после гормональной стимуляции яичников, было сниженным, и среди них не было зрелых стадий	Kala, Nivsarkar, 2016
	На протяжении 30 дней разные стрессоры воздействовали на самок мышей: изоляция; скученность плюс наклон клетки; плавание, в том числе в холодной воде; горячий воздух; отсутствие пищи и воды; влажная подстилка; встряхивание; сдвиг светло-темного периода	Подавление развития и атрезия фолликулов. Подавление экспрессии GDF-9*** Снижение экспрессии BDNF**** в антральных фолликулах. Отсутствие влияния на экспрессию BDNF в примордиальных, первичных и вторичных фолликулах. Снижение числа извлеченных ооцитов и доли развившихся бластоцист	Wu L.M. et al., 2012b Wu L.M. et al., 2012a

* HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) – гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста.

** TNF-α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли-альфа.

*** GDF-9 (growth /differentiation factor 9) – фактор роста /дифференциации 9.

**** BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротропный фактор мозга.

антральных фолликулах, но не влиял на экспрессию BDNF в примордиальных, первичных и вторичных фолликулах (Wu L.M. et al., 2012a). Хронический непредсказуемый стресс снижал также число извлеченных ооцитов и долю образовавшихся blastоцист при проведении ЭКО и последующем развитии полученных эмбрионов *in vitro*, что было скорректировано с помощью экзогенного BDNF.

Влияние психоэмоционального стресса на потенциал развития ооцитов и преимплантационных эмбрионов может осуществляться и через другие механизмы. Использование рестрикционного стресса на мышах показало, что у самок в преовуляторных ооцитах на стадии герминального везикула (GV стадия) подавляется переход конфигурации гетерохроматина от NSN типа (non surrounded nucleolus, «неокруженное» ядрышко) к SN типу (surrounded nucleolus, «окруженное» ядрышко), снижается ацетилирование и метилирование гистонов в ооцитах SN типа и, таким образом, ухудшается потенциал развития ооцитов (Wu X.F. et al., 2015).

Кроме того, психоэмоциональный стресс может приводить к нарушению мейотического деления в ооцитах. При этом у стрессированных самок увеличивалась доля анеуплоидии в зрелых ооцитах, а процентное содержание анеуплоидных ооцитов было в три раза выше в ооцитах с ускоренным созреванием по сравнению с запаздывающими (Zhou et al., 2012). Исследователи пришли к выводу, что стресс матери может нарушить сборку веретена деления за счет инактивации сверочной точки сборки веретена деления (spindle-assembly checkpoint, SAC), вызванной окислительным стрессом внутри ооцитов (Zhou et al., 2012).

Помимо гормонального дисбаланса, психологический стресс повышает образование активных форм кислорода в организме. Высокий уровень активных форм кислорода запускает окислительный стресс, что сопровождается остановкой мейотического клеточного цикла и, следовательно, апоптозом (Prasad et al., 2016; Chaudhary et al., 2019). Это утверждение дополнительно подкрепляется наблюдениями о том, что окислительный стресс провоцирует апоптоз гранулезных клеток и приводит к снижению уровня эстрадиола, частоты овуляции и качества ооцитов (Tirpathi et al., 2013). Кроме того, вызванный окислительным стрессом апоптоз гранулезных клеток ухудшает контакты этих клеток с ооцитами, что непосредственно влияет на поступление питательных веществ и доступность факторов роста, от которых зависит качество ооцитов в преовуляторных фолликулах яичника (Prasad et al., 2016). В экспериментах на модели рестрикции было показано, что стресс вызывал накопление активных форм кислорода в сыворотке крови мышей, яичниках и ооцитах, а также приводил к снижению количества blastоцист, развивающихся в условиях *in vitro* из этих ооцитов, и числа клеток в них (Lian et al., 2013).

В целом следует отметить, что на сегодняшний день хорошо изучен механизм негативного воздействия хронического стресса на яичник через ингибирование высвобождения гонадотропинов, тогда как другие овариальные регуляторные механизмы, участвующие в этом процессе, исследованы недостаточно. Понимание паракринных механизмов воздействия стресса на оогенез и, соответствен-

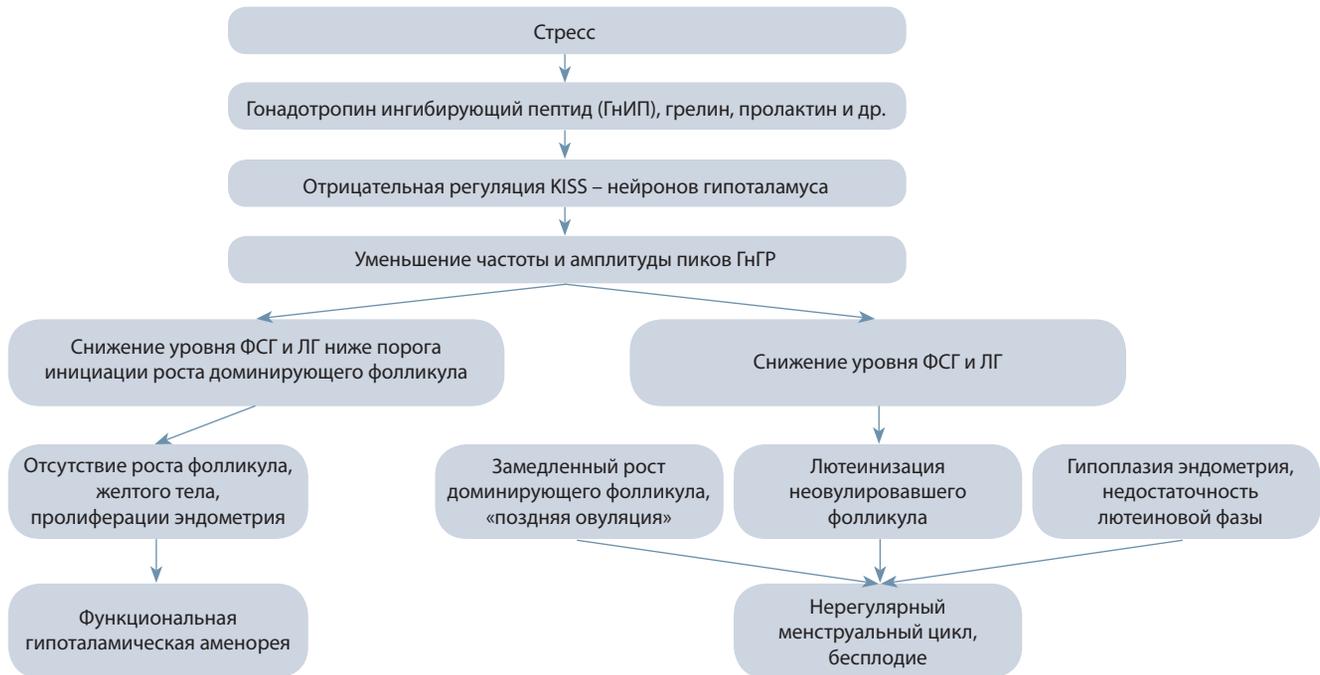
но, на развитие эмбрионов важно для более эффективного применения медицинских репродуктивных технологий в отношении пациентов в состоянии хронического психоэмоционального стресса.

Влияние стресса на женскую репродуктивную функцию: клинические данные

Клинические данные без применения ВРТ

Наиболее яркое клиническое проявление стресс-индуцированных нарушений фолликулогенеза – функциональная гипоталамическая аменорея, признаком которой является отсутствие менструации в течение трех и более месяцев при изначально сохранной менструальной функции (Warren, Fried, 2001). Прежде всего, функциональная гипоталамическая аменорея характеризуется снижением частоты и амплитуды пиков выделения гонадотропин-рилизинг гормона, что приводит к уменьшению выработки фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) гипофизом и, как следствие, к отсутствию гормон-зависимого роста фолликулов, нарушению перехода от вторичных к малым антральным фолликулам, нарушению формирования пула растущих фолликулов, отсутствию доминантного фолликула и, соответственно, желтого тела. На этом фоне наблюдается снижение продукции эстрадиола в яичниках, что сопровождается отсутствием пролиферации эндометрия матки и отсутствием менструации (Fourman, Fazeli, 2015; Prokai, Berga, 2016).

Другие гипоталамические нарушения фолликулогенеза, вызванные стрессом, могут носить не столь выраженный характер, как аменорея. Среди субклинических проявлений отметим удлинение и нерегулярность менструального цикла, недостаточность лютеиновой фазы цикла, лютеинизацию неовулировавшего фолликула (Berga, Loucks, 2007; Palm-Fischbacher, Ehlert, 2014) и отсутствие зрелого ооцита в овулировавшем фолликуле (Tamura et al., 2013). В случае субклинических проявлений тоже имеет место снижение выработки гонадотропин-рилизинг гормона, однако ФСГ все же достигает уровня, достаточного для инициации роста фолликула. При этом рост фолликула может быть замедленным, что выражается в удлинении первой фазы цикла и поздней овуляции, а выработка эстрадиола снижена, что может приводить к гипоплазии эндометрия (Berga, Loucks, 2007; McEwen et al., 2012). Изменение пульсации гонадотропин-рилизинг гормона влияет также на интенсивность и частоту пиков ЛГ, хотя сывороточный уровень ЛГ может оставаться нормальным или незначительно сниженным (Krsmanovic et al., 2009). Дефицит выработки гонадотропин-рилизинг гормона и эстрадиола может приводить к неполноценному пику ЛГ в преовуляторный период и проявляться лютеинизацией неовулировавшего фолликула, в том числе с формированием кист яичника, и сниженной выработкой прогестерона во вторую фазу цикла – недостаточностью лютеиновой фазы (Berga, Loucks, 2007). Кроме того, для хронического стресса характерна повышенная секреция кортизола преимущественно в ночное время, при нормальном уровне суточной и утренней секреции (McEwen, 2000), что также способствует уменьшению амплитуды или даже отсут-



Воздействие стресса на женскую репродуктивную функцию.

ствию овуляторного пика гонадотропинов, который чаще приходится на ночное время (Cahill et al., 1998).

Безусловно, не у всех женщин стрессовые ситуации приводят к нарушению фолликулогенеза и менструального цикла (McComb et al., 2006; Ellison et al., 2007). Выделяют как физиологические, так и психологические факторы устойчивости к стрессу и нарушениям функции яичников (Wingfield, Sapolsky, 2003; Palm-Fischbacher, Ehlert, 2014). К факторам, повышающим устойчивость репродуктивной системы к подавляющему действию стресса, относятся блокада на уровне центральной нервной системы (стрессор не воспринимается), блокада на уровне гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (нарушение секреции глюкокортикоидов), блокада на уровне гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы (устойчивость половых желез к действию глюкокортикоидов), защита от действия глюкокортикостероидов с помощью белка, связывающего стероиды (Wingfield, Sapolsky, 2003).

При развитии гипоталамической аменореи реализация репродуктивной функции становится невозможной ввиду отсутствия роста фолликула и зрелого ооцита, а также соответствующей подготовки эндометрия. В случае стрессовых воздействий с формированием лютеинизации неовулировавшего фолликула и дефицита лютеиновой фазы отсутствия менструаций (аменореи) не наблюдается, но репродуктивный потенциал значительно снижается (Lynch et al., 2014). Подобные нарушения могут быть скорректированы назначением соответствующих лекарственных препаратов, восполняющих дефицит гипофизарных и/или стероидных гормонов. Тем не менее существует проблема бесплодия неясного генеза при ненарушенном фолликулогенезе и овуляции. Более детальное изучение оогенеза стало возможным с распространением методов ВРТ.

Существует множество свидетельств увеличения ранних потерь беременности, не связанных с хромосомными аномалиями, на фоне повышенной тревожности и депрессии, в том числе у пациенток с выкидышами в анамнезе. В то же время потери беременности сами являются мощным стрессирующим фактором, что может приводить к образованию патологического круга привычного невынашивания беременности (Quenby et al., 2021; Wang et al., 2021). Ранние потери беременности говорят о нарушении жизнеспособности эмбриона и/или его взаимодействия с маткой после имплантации, что происходит, вероятно, вследствие нарушения гаметогенеза, подготовки эндометрия к беременности и/или развития иммунологической толерантности материнского организма. Все перечисленные состояния описаны как возможные последствия стресса, переживаемого женщиной в период зачатия и на ранних сроках беременности (Wadhwa, 2005; Nepomnaschy et al., 2006). Эти явления могут приводить к нарушению плацентации и развитию осложнений беременности, характерных для более поздних сроков, таких как фетоплацентарная недостаточность, преэклампсия, преждевременные роды, а также влиять на здоровье детей (Parker, Douglas, 2010; Witt et al., 2012). Механизмы, приводящие к изменению функции яичников при стрессе, представлены на рисунке.

Клинические данные, полученные при применении ВРТ

Отличительной особенностью регуляции фолликулогенеза при ВРТ является использование гонадотропинов с целью индукции роста нескольких фолликулов – контролируемой овариальной гиперстимуляции. При этом эндогенный дефицит кортикотропин-рилизинг гормона, ФСГ и ЛГ, о котором шла речь в предыдущем разделе,

перестает иметь значение, так как возможный их дефицит с избытком компенсируется экзогенным введением. Более того, современные протоколы контролируемой овариальной гиперстимуляции подразумевают блокаду выработки эндогенного гонадотропин-рилизинг гормона агонистами или антагонистами с целью предотвращения преждевременной овуляции. Принимая во внимание вышесказанное, можно заключить, что при применении ВРТ стресс-индуцированное нарушение оогенеза реализуется не снижением выработки гормонов гипоталамуса и гипофиза, а посредством других механизмов, которые были описаны в разделе с экспериментальными данными на животных моделях.

Врачи-репродуктологи неоднократно отмечали неудачи попыток ВРТ на фоне неблагоприятных жизненных событий (смерть родственника, разлад в семье и т.п.), наблюдая на практике случаи получения «необъяснимо низкого» качества/количества ооцитов и эмбрионов в программах ВРТ при изначально хорошем прогнозе и «необъяснимого» улучшения качества/количества ооцитов и эмбрионов в повторных попытках при использовании тех же протоколов контролируемой овариальной гиперстимуляции с сохранением или незначительным изменением дозировки вводимых препаратов (Ebbesen et al., 2009; Meldrum, 2016). Возможное объяснение подобных наблюдений – угнетающее действие стрессовых реакций организма на гаметогенез.

Данные клинических исследований на людях достаточно противоречивы. Существенная их часть указывает на угнетающее влияние психологического стресса на результаты ВРТ. Так, в исследовании с участием 809 женщин, получавших помощь ВРТ в первый раз, показано снижение количества полученных ооцитов, качества эмбрионов и частоты наступления беременности при увеличении числа неблагоприятных жизненных событий, снижающих качество жизни, а также увеличении уровня воспринимаемого стресса за месяц до лечения бесплодия с помощью ВРТ (Ebbesen et al., 2009). В другой статье отмечено влияние исходного стресса на количество полученных и оплодотворенных ооцитов, а также на наступление беременности и показатель живорождения (Klonoff-Cohen et al., 2001). В работе (Li et al., 2011) было выявлено, что исходный психологический стресс негативно связан с частотой наступления беременности в программах ВРТ, но внутрифолликулярные концентрации норадреналина не различались в группе наступившей и не наступившей беременности. Другие авторы изучали связь результатов ВРТ с уровнем тревожности и сывороточными концентрациями кортизола и норадреналина (An et al., 2013). Была продемонстрирована связь повышенных значений кортизола и норадреналина с уровнем тревожности и отрицательная корреляция с частотой наступления беременности и живорождения (An et al., 2013).

В более поздней работе опубликованы результаты изучения связи кортизола слюны, волос и исходов ВРТ, полученные с участием 135 женщин (Massey et al., 2016). Показано, что уровни кортизола слюны не имели прогностической значимости в отношении результатов ВРТ, тогда как более низкая концентрация кортизола в волосах достоверно предсказывала клиническую беременность.

В недавнем исследовании с участием 304 женщин было выявлено, что более 80 % респондентов имели повышенные уровни тревожности и депрессии, и усиление симптомов обратно коррелировало с успешностью цикла ВРТ (Aimagambetova et al., 2020).

В то же время не всегда удается выявить связь уровня тревожности, воспринимаемого стресса, уровня кортизола в слюне и сыворотке с репродуктивными исходами у пациенток ВРТ (Lovely et al., 2003; Cesta et al., 2018). N. Miller с коллегами оценивали уровень тревожности по «Шкале стресса», концентрацию кортизола слюны в начале цикла ВРТ, в день пункции фолликулов и в день переноса эмбрионов, а также измеряли уровень кортизола в фолликулярной жидкости (Miller et al., 2019). Авторы отметили повышение кортизола и тревожности в день пункции фолликулов, но не выявили связи с частотой наступления беременности. Кроме того, повышенный уровень фолликулярного кортизола коррелировал с положительными исходами ВРТ. Было также показано, что неудача ЭКО предсказывает последующий психологический дистресс, однако психологический дистресс перед ЭКО не предсказывает неудачу ЭКО (Pasch et al., 2012). При сравнении уровня стресса и количества получаемых ооцитов в программах ВРТ с целью лечения бесплодия и при криоконсервации ооцитов был отмечен значительно более высокий уровень стресса у пациентов с бесплодием, но количество ооцитов было сопоставимым в обеих группах (Adeleye et al., 2020).

Можно заключить, что несмотря на большое количество публикаций, посвященных влиянию стресса на репродуктивную функцию и результативность ВРТ у людей, их данные весьма противоречивы. Обращают на себя внимание не только различные размеры групп исследования, но и различные подходы к оценке переживаемого стресса и тревожности, использование/неиспользование стрессовых биомаркеров, отсутствие рандомизации. Как правило, не учитывается факт, что знание пациентом своего прогноза может значительно влиять на оценку уровня хронического стресса и результаты анкетирования. В связи с неоднородностью опубликованных данных выводы работ тоже противоречивы. Большинство авторов призывает к осторожности в выводах о связи стресса и репродуктивной функции, опираясь как на результаты некоторых научных статей, так и на общебиологические соображения о невозможности полного отключения репродуктивной функции в неблагоприятные периоды в связи с необходимостью выживания вида (Wingfield, Sapolsky, 2003; Rooney, Domar, 2018; Lawson, 2020).

Психотерапия как способ снижения негативного влияния психоэмоционального стресса на репродуктивную систему

Появление данных, свидетельствующих о значительном влиянии психосоциального стресса на репродуктивную систему, способствовало увеличению научных работ, направленных на изучение психотерапевтических воздействий при лечении бесплодия.

В одной из ранних работ, посвященной этой теме, подчеркивается острая необходимость в соответствующих стандартам качества исследованиях для объективной

оценки (Boivin, 2003). Автор провел анализ 38 публикаций, 25 из которых были классифицированы как независимые, и только восемь из них отвечали минимальным стандартам качества. В итоге три из восьми исследований хорошего качества показали более высокую частоту наступления беременности в группе, получавшей психосоциальные вмешательства, по сравнению с группой, получавшей рутинный уход (Boivin, 2003). В другой работе был проведен метаанализ 22 оригинальных исследований, который свидетельствует о том, что психотерапия (групповая и индивидуально/в паре) снижает тревожность и депрессию у бесплодных пациентов и, возможно, повышает успешность зачатия (Liz, Strauss, 2005). В обзоре (Campragne, 2006) рекомендовано планирование медикаментозного лечения бесплодия с учетом уровня стресса, а также терапия, направленная на снижение стресса до начала лечения непосредственно бесплодия.

В последующих публикациях также представлены противоречивые результаты применения психологических методик. Так, K. Hämmerli с коллегами включили в свой метаанализ 21 контролируемое исследование и пришли к заключению, что психологические вмешательства не были связаны с какими-либо значительными изменениями психологического статуса, однако положительно влияли на частоту наступления беременности у пациентов, получавших лечение без применения ВРТ (Hämmerli et al., 2009). Они также пришли к выводу, что терапия из шести или более сеансов была эффективнее по сравнению с менее длительной терапией. В статье (Frederiksen et al., 2015) был проведен метаанализ 39 оригинальных работ, показавший положительные результаты: женщины, получавшие ту или иную форму психотерапевтического вмешательства, примерно в два раза чаще становились беременными по сравнению с контрольной группой, получавшей стандартное лечение.

В систематический обзор (Ying et al., 2016) были включены только 20 рандомизированных исследований. Авторы пришли к выводу, что наблюдались методологические проблемы с публикациями, в которых сообщалось о значительных результатах как в отношении частоты наступления беременности, так и в отношении психологического стресса, и рекомендовали провести более тщательное изучение данного вопроса, особенно для наиболее стрессового периода у пациенток с бесплодием – ожидания результатов теста на беременность. В обзоре (Gaitzsch et al., 2020) только две из шести работ показали значимое положительное влияние психологических воздействий. В то же время метаанализ, включающий 15 научных публикаций, выявил положительную связь между психосоциальными вмешательствами, особенно длительными, и частотой наступления беременности у бесплодных женщин и пар, получающих лечение с применением ВРТ (Katyala et al., 2021).

Таким образом, многие ученые подчеркивают наличие методологических и практических вопросов к накопленным в настоящее время данным. Они призывают увеличить количество поисковых исследований и ввести стандартизированные программы психологической помощи. Положительные эффекты психотерапии, наблюдаемые в некоторых случаях, указывают на перспективность развития данного направления.

Заключение

Выявление хронического психоэмоционального стресса представляет определенные сложности как у человека, так и у лабораторных животных, используемых в качестве моделей для исследований. Использование психологических тестов и опросников у человека является «золотым стандартом», однако требует большого количества времени, может не отражать реальную картину в силу субъективных искажений, вносимых опрашиваемым (Slavich, Shields, 2018; Crosswell, Lockwood, 2020). Важно и то, что применение психологических тестов и опросников недоступно у лабораторных животных. Поэтому изучение патогенеза воздействия стресса на организм, репродуктивную функцию и здоровье потомства, поиск информативных биомаркеров стресса, которые можно объективно измерить и оценить, крайне важны для проведения лабораторных экспериментов и внедрения в клиническую практику.

Использование животных моделей помогает более детально понять механизмы влияния медицинских процедур и стресса на репродуктивную функцию и здоровье потомства. В результате проведенного анализа литературы можно сделать заключение о том, что стресс негативно влияет на развитие ооцитов яичника, а также последующее развитие полученных из них эмбрионов; выявлена роль некоторых паракринных факторов яичника, которые задействованы в этих процессах. Между тем необходимо дополнительно исследовать влияние психоэмоционального стресса на результаты ЭКО и эмбриотрансфера, поскольку пока имеется лишь несколько работ на лабораторных животных в этой области, а клинические данные противоречивы и сложно интерпретируемы.

Работы, проведенные на лабораторных животных, показывают эффективность использования таких факторов, как GDF-9 и BDNF, для уменьшения угнетающего влияния стресса на фолликулогенез и развитие эмбрионов, что в дальнейшем может найти применение в репродуктивной медицине. Наряду с этим, внедрение психотерапевтических методик может повысить устойчивость к стрессу на уровне центральной нервной системы, т.е. повлиять на восприятие стрессорного события или стимула. Существуют исследования, подтверждающие эффективность психологических методик в снижении психологического стресса, а также их связь со значительным увеличением частоты наступления беременности (Hämmerli et al., 2009; Frederiksen et al., 2015; Katyala et al., 2021). Учитывая уровень стресса, о котором сообщают многие бесплодные женщины, важно повышать доступность психотерапевтических методик в репродуктивной медицине.

Список литературы / References

- Рагаева Д.С., Игонина Т.Н., Брусенцев Е.Ю., Рожкова И.Н., Амстиславский С.Я. Отдаленные последствия ранних пренатальных воздействий на физиологические и поведенческие характеристики потомков. *Успехи физиол. наук.* 2018;49(4):30-44. DOI 10.7868/S0301179818040033.
[Ragaeva D.S., Igonina T.N., Brusentsev E.Yu., Rozhkova I.N., Amstislavsky S.Ya. Long-term effects of early prenatal impact on the offspring development, physiology and behavior. *Uspekhi Fiziologicheskikh Nauk = Progress in Physiological Science.* 2018; 49(4):30-44. (in Russian)]

- Adeleye A., Cruz K., Pasch L., Huddleston H. Differences in perceived stress during ovarian stimulation between women with infertility and those pursuing oocyte cryopreservation. *Fertil. Steril.* 2020; 114(5):1076-1084. DOI 10.1016/j.fertnstert.2020.05.025.
- Aimagambetova G., Issanov A., Terzic S., Bapayeva G., Ukybassova T., Baikoshkarova S., Aldiyarova A., Shauyen F., Terzic M. The effect of psychological distress on IVF outcomes: reality or speculations? *PLoS One.* 2020;15(12):e0242024. DOI 10.1371/journal.pone.0242024.
- An Y., Sun Z., Li L., Zhang Y., Ji H. Relationship between psychological stress and reproductive outcome in women undergoing in vitro fertilization treatment: psychological and neurohormonal assessment. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2013;30(1):35-41. DOI 10.1007/s10815-012-9904-x.
- Berga S.L., Loucks T.L. Stress Induced Anovulation. Atlanta, Elsevier, USA: Emory Univ. School of Medicine, 2007;615-631.
- Boivin J. A review of psychosocial interventions in infertility. *Soc. Sci. Med.* 2003;57(12):2325-2341. DOI 10.1016/s0277-9536(03)00138-2.
- Burkus J., Cikos S., Fabian D., Kubandova J., Czikkova S., Koppel J. Maternal restraint stress negatively influences growth capacity of preimplantation mouse embryos. *Gen. Physiol. Biophys.* 2013; 32(1):129-137. DOI 10.4149/gpb_2013010.
- Burstein O., Doron R. The unpredictable chronic mild stress protocol for inducing anhedonia in mice. *J. Vis. Exp.* 2018;140:58184. DOI 10.3791/58184.
- Cahill D.J., Wardle P.G., Harlow C.R., Hull M.G. Onset of the pre-ovulatory luteinizing hormone surge: diurnal timing and critical follicular prerequisites. *Fertil. Steril.* 1998;70(1):56-59. DOI 10.1016/s0015-0282(98)00113-7.
- Campagne D.M. Should fertilization treatment start with reducing stress? *Hum. Reprod.* 2006;21(7):1651-1658. DOI 10.1093/humrep/del078.
- Campos A.C., Fogaca M.V., Aguiar D.C., Guimaraes F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz. J. Psychiatry.* 2013; 35(Suppl.2):S101-S111. DOI 10.1590/1516-4446-2013-1139.
- Cesta C.E., Johansson A.L.V., Hreinsson J., Rodriguez-Wallberg K.A., Olofsson J.I., Holte J., Wramsby H., Wramsby M., Chatterji S., Skalkidou A., Nyman Iliadou A. A prospective investigation of perceived stress, infertility-related stress, and cortisol levels in women undergoing in vitro fertilization: influence on embryo quality and clinical pregnancy rate. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2018;97(3): 258-268. DOI 10.1111/aogs.13280.
- Chaudhary G.R., Yadav P.K., Yadav A.K., Tiwari M., Gupta A., Sharma A., Pandey A.N., Pandey A.K., Chaube S.K. Necroptosis in stressed ovary. *J. Biomed. Sci.* 2019;26(1):11. DOI 10.1186/s12929-019-0504-2.
- Cousineau T.M., Domar A.D. Psychological impact of infertility. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2007;21(2):293-308. DOI 10.1016/j.bpobgyn.2006.12.003.
- Crosswell A.D., Lockwood K.G. Best practices for stress measurement: how to measure psychological stress in health research. *Health Psychol. Open.* 2020;7(2):2055102920933072. DOI 10.1177/2055102920933072.
- Di Natale M.R., Soch A., Ziko I., De Luca S.N., Spencer S.J., Sominsky L. Chronic predator stress in female mice reduces primordial follicle numbers: implications for the role of ghrelin. *J. Endocrinol.* 2019;241(3):201-219. DOI 10.1530/JOE-19-0109.
- Ebbesen S.M., Zachariae R., Mehlsen M.Y., Thomsen D., Hojgaard A., Ottosen L., Petersen T., Ingerslev H.J. Stressful life events are associated with a poor in-vitro fertilization (IVF) outcome: a prospective study. *Hum. Reprod.* 2009;24(9):2173-2182. DOI 10.1093/humrep/dep185.
- Ellison P.T., Lipson S.F., Jasienska G., Ellison P.L. Moderate anxiety, whether acute or chronic, is not associated with ovarian suppression in healthy, well-nourished, Western women. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2007;134(4):513-519. DOI 10.1002/ajpa.20698.
- Fitzgerald E., Parent C., Kee M.Z.L., Meaney M.J. Maternal distress and offspring neurodevelopment: challenges and opportunities for pre-clinical research models. *Front. Hum. Neurosci.* 2021;15: 635304. DOI 10.3389/fnhum.2021.635304.
- Fourman L.T., Fazeli P.K. Neuroendocrine causes of amenorrhea – an update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015;100(3):812-824. DOI 10.1210/jc.2014-3344.
- Frederiksen Y., Farver-Vestergaard I., Skovgard N.G., Ingerslev H.J., Zachariae R. Efficacy of psychosocial interventions for psychological and pregnancy outcomes in infertile women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2015;5(1):e006592. DOI 10.1136/bmjopen-2014-006592.
- Gadek-Michalska A., Tadeusz J., Bugajski A., Bugajski J. Chronic isolation stress affects subsequent crowding stress-induced brain nitric oxide synthase (NOS) isoforms and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis responses. *Neurotox. Res.* 2019;36(3):523-539. DOI 10.1007/s12640-019-00067-1.
- Gaitzsch H., Benard J., Hugon-Rodin J., Benzakour L., Streuli I. The effect of mind-body interventions on psychological and pregnancy outcomes in infertile women: a systematic review. *Arch. Womens Ment. Health.* 2020;23(4):479-491. DOI 10.1007/s00737-019-10109-8.
- Gao Y., Chen F., Kong Q.Q., Ning S.F., Yuan H.J., Lian H.Y., Luo M.J., Tan J.H. Stresses on female mice impair oocyte developmental potential: effects of stress severity and duration on oocytes at the growing follicle stage. *Reprod. Sci.* 2016;23(9):1148-1157. DOI 10.1177/1933719116630416.
- Haller J., Fuchs E., Halasz J., Makara G.B. Defeat is a major stressor in males while social instability is stressful mainly in females: towards the development of a social stress model in female rats. *Brain Res. Bull.* 1999;50(1):33-39. DOI 10.1016/s0361-9230(99)00087-8.
- Hämmerli K., Znoj H., Barth J. The efficacy of psychological interventions for infertile patients: a meta-analysis examining mental health and pregnancy rate. *Hum. Reprod. Update.* 2009;15(3):279-295. DOI 10.1093/humupd/dmp002.
- Kala M., Nivsarkar M. Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2016;225:117-124. DOI 10.1016/j.ygcen.2015.09.010.
- Katyala N., Poulsen C.M., Knudsen U.B., Frederiksen Y. The association between psychosocial interventions and fertility treatment outcome: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2021;259:125-132. DOI 10.1016/j.ejogrb.2021.02.012.
- Kiaekou E., Zapanti E., Mastorakos G., Loutradis D. Update on the role of ovarian corticotropin-releasing hormone. *Ann. NY Acad. Sci.* 2010;1205:225-229. DOI 10.1111/j.1749-6632.2010.05685.x.
- Klonoff-Cohen H., Chu E., Natarajan L., Sieber W. A prospective study of stress among women undergoing in vitro fertilization or gamete intrafallopian transfer. *Fertil. Steril.* 2001;76(4):675-687. DOI 10.1016/s0015-0282(01)02008-8.
- Krsmanovic L.Z., Hu L., Leung P.K., Feng H., Catt K.J. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009;20(8):402-408. DOI 10.1016/j.tem.2009.05.002.
- Lawson A.K. Caution is warranted when discussing correlations between stress and reproductive outcomes. *Fertil. Steril.* 2020;114(5): 972-973. DOI 10.1016/j.fertnstert.2020.07.054.
- Li X.H., Ma Y.G., Geng L.H., Qin L., Hu H., Li S.W. Baseline psychological stress and ovarian norepinephrine levels negatively affect the outcome of in vitro fertilisation. *Gynecol. Endocrinol.* 2011; 27(3):139-143. DOI 10.3109/09513590.2010.501871.
- Lian H.Y., Gao Y., Jiao G.Z., Sun M.J., Wu X.F., Wang T.Y., Li H., Tan J.H. Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. *Reproduction.* 2013;146(6):559-568. DOI 10.1530/REP-13-0268.

- Liang B., Wei D.L., Cheng Y.N., Yuan H.J., Lin J., Cui X.Z., Luo M.J., Tan J.H. Restraint stress impairs oocyte developmental potential in mice: role of CRH-induced apoptosis of ovarian cells. *Biol. Reprod.* 2013;89(3):64. DOI 10.1095/biolreprod.113.110619.
- Liu Y.X., Cheng Y.N., Miao Y.L., Wei D.L., Zhao L.H., Luo M.J., Tan J.H. Psychological stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: a study using the predatory stress model. *PLoS One.* 2012;7(10):e48083. DOI 10.1371/journal.pone.0048083.
- Liz de T.M., Strauss B. Differential efficacy of group and individual/couple psychotherapy with infertile patients. *Hum. Reprod.* 2005; 20(5):1324-1332. DOI 10.1093/humrep/deh743.
- Louis G.M., Lum K.J., Sundaram R., Chen Z., Kim S., Lynch C.D., Schisterman E.F., Pyper C. Stress reduces conception probabilities across the fertile window: evidence in support of relaxation. *Fertil. Steril.* 2011;95(7):2184-2189. DOI 10.1016/j.fertnstert.2010.06.078.
- Lovely L.P., Meyer W.R., Ekstrom R.D., Golden R.N. Effect of stress on pregnancy outcome among women undergoing assisted reproduction procedures. *South. Med. J.* 2003;96(6):548-551. DOI 10.1097/01.SMJ.0000054567.79881.E9.
- Lynch C.D., Sundaram R., Maisog J.M., Sweeney A.M., Buck Louis G.M. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study – the LIFE study. *Hum. Reprod.* 2014;29(5):1067-1075. DOI 10.1093/humrep/deu032.
- Massey A.J., Campbell B.K., Raine-Fenning N., Pincott-Allen C., Perry J., Vedhara K. Relationship between hair and salivary cortisol and pregnancy in women undergoing IVF. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;74:397-405. DOI 10.1016/j.psyneuen.2016.08.027.
- McComb J.J.R., Qian X.-P., Veldhuis J.D., McGlone J.J., Norman R.L. Neuroendocrine responses to psychological stress in eumenorrheic and oligomenorrheic women. *Stress.* 2006;9(1):41-51. DOI 10.1080/10253890600591678.
- McEwen B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000;886(1-2):172-189. DOI 10.1016/S0006-8993(00)02950-4.
- McEwen B.S., Akama K.T., Spencer-Segal J.L., Milner T.A., Waters E.M. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behav. Neurosci.* 2012;126(1):4-16. DOI 10.1037/a0026708.
- Meldrum D.R. Introduction: examining the many potential reasons why euploid blastocysts do not always result in viable pregnancies: part 1. *Fertil. Steril.* 2016;105(3):545-547. DOI 10.1016/j.fertnstert.2015.12.007.
- Miller N., Herzberger E.H., Pasternak Y., Klement A.H., Shavit T., Yaniv R.T., Ghetler Y., Neumark E., Eisenberg M.M., Berkovitz A., Shulman A., Wisner A. Does stress affect IVF outcomes? A prospective study of physiological and psychological stress in women undergoing IVF. *Reprod. Biomed. Online.* 2019;39(1):93-101. DOI 10.1016/j.rbmo.2019.01.012.
- Muscattell K.A., Eisenberger N.I. A social neuroscience perspective on stress and health. *Soc. Personal. Psychol. Compass.* 2012;6(12): 890-904. DOI 10.1111/j.1751-9004.2012.00467.x.
- Nepomnaschy P.A., Welch K.B., McConnell D.S., Low B.S., Strassmann B.I., England B.G. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(10):3938-3942. DOI 10.1073/pnas.0511183103.
- Palm-Fischbacher S., Ehlert U. Dispositional resilience as a moderator of the relationship between chronic stress and irregular menstrual cycle. *J. Psychosom. Obstet. Gynaecol.* 2014;35(2):42-50. DOI 10.3109/0167482X.2014.912209.
- Parker V.J., Douglas A.J. Stress in early pregnancy: maternal neuroendocrine-immune responses and effects. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 85(1):86-92. DOI 10.1016/j.jri.2009.10.011.
- Pasch L.A., Gregorich S.E., Katz P.K., Millstein S.G., Nachtigall R.D., Bleil M.E., Adler N.E. Psychological distress and in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* 2012;98(2):459-464. DOI 10.1016/j.fertnstert.2012.05.023.
- Prasad S., Tiwari M., Pandey A.N., Shrivastav T.G., Chaube S.K. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *J. Biomed. Sci.* 2016;23:36. DOI 10.1186/s12929-016-0253-4.
- Prokai D., Berga S.L. Neuroprotection via reduction in stress: altered menstrual patterns as a marker for stress and implications for long-term neurologic health in women. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(12):2147. DOI 10.3390/ijms17122147.
- Quenby S., Gallos I.D., Dhillon-Smith R.K., Podesek M., Stephenson M.D., Fisher J., Brosens J.J., Brewin J., Ramhorst R., Lucas E.S., McCoy R.C., Anderson R., Daher S., Regan L., Al-Memar M., Bourne T., MacIntyre D.A., Rai R., Christiansen O.B., Sugiura-Ogasawara M., Odendaal J., Devall A.J., Bennett P.R., Petrou S., Coomarasamy A. Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. *Lancet.* 2021;397(10285):1658-1667. DOI 10.1016/S0140-6736(21)00682-6.
- Rockliff H.E., Lightman S.L., Rhidian E., Buchanan H., Gordon U., Vedhara K. A systematic review of psychosocial factors associated with emotional adjustment in *in vitro* fertilization patients. *Hum. Reprod. Update.* 2014;20(4):594-613. DOI 10.1093/humupd/dmu010.
- Rooney K.L., Domar A.D. The relationship between stress and infertility. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2018;20(1):41-47. DOI 10.31887/DCNS.2018.20.1/klrooney.
- Sanchez-Gonzalez B., Planillo A., Navarro-Castilla A., Barja I. The concentration of fear: mice's behavioural and physiological stress responses to different degrees of predation risk. *Naturwissenschaften.* 2018;105(1-2):16. DOI 10.1007/s00114-018-1540-6.
- Slavich G.M., Shields G.S. Assessing lifetime stress exposure using the stress and adversity inventory for adults (adult STRAIN): an overview and initial validation. *Psychosom. Med.* 2018;80(1):17-27. DOI 10.1097/PSY.0000000000000534.
- Tamura H., Takasaki A., Taketani T., Tanabe M., Kizuka F., Lee L., Tamura I., Maekawa R., Asada H., Yamagata Y., Sugino N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr. J.* 2013;60(1):1-13. DOI 10.1507/endocrj.ej12-0263.
- Tripathi A., Shrivastav T.G., Chaube S.K. An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* 2013; 3(1):27-36. DOI 10.4103/2229-516X.112238.
- Wadhwa P.D. Psychoneuroendocrine processes in human pregnancy influence fetal development and health. *Psychoneuroendocrinology.* 2005;30(8):724-743. DOI 10.1016/j.psyneuen.2005.02.004.
- Wang Y., Meng Z., Pei J., Qian L., Mao B., Li Y., Li J., Dai Z., Cao J., Zhang C., Chen L., Jin Y., Yi B. Anxiety and depression are risk factors for recurrent pregnancy loss: a nested case-control study. *Health Qual. Life Outcomes.* 2021;19(1):78. DOI 10.1186/s12955-021-01703-1.
- Warren M.P., Fried J.L. Hypothalamic amenorrhea. The effects of environmental stresses on the reproductive system: a central effect of the central nervous system. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2001; 30(3):611-629. DOI 10.1016/S0889-8529(05)70204-8.
- Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008;32(6):1073-1086. DOI 10.1016/j.neubiorev.2008.03.002.
- Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: effects on behavior. *Neurobiol. Stress.* 2016;6:3-13. DOI 10.1016/j.ynstr.2016.08.004.
- Wiebold J.L., Stanfield P.H., Becker W.C., Hillers J.K. The effect of restraint stress in early pregnancy in mice. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78(1):185-192. DOI 10.1530/jrf.0.0780185.
- Wingfield J.C., Sapolsky R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.* 2003;15(8):711-724. DOI 10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x.
- Witt W.P., Wisk L.E., Cheng E.R., Hampton J.M., Hagen E.W. Preconception mental health predicts pregnancy complications and ad-

- verse birth outcomes: a national population-based study. *Matern. Child Health J.* 2012;16(7):1525-1541. DOI 10.1007/s10995-011-0916-4.
- Wu L.M., Hu M.H., Tong X.H., Han H., Shen N., Jin R.T., Wang W., Zhou G.X., He G.P., Liu Y.S. Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One.* 2012a;7(12):e52331. DOI 10.1371/journal.pone.0052331.
- Wu L.M., Liu Y.S., Tong X.H., Shen N., Jin R.T., Han H., Hu M.H., Wang W., Zhou G.X. Inhibition of follicular development induced by chronic unpredictable stress is associated with growth and differentiation factor 9 and gonadotropin in mice. *Biol. Reprod.* 2012b;86(4):121. DOI 10.1095/biolreprod.111.093468.
- Wu X.F., Yuan H.J., Li H., Gong S., Lin J., Miao Y.L., Wang T.Y., Tan J.H. Restraint stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: roles of chromatin configuration and histone modification in germinal vesicle stage oocytes. *Biol. Reprod.* 2015;92(1):13. DOI 10.1095/biolreprod.114.124396.
- Ying L., Wu L.H., Loke A.Y. The effects of psychosocial interventions on the mental health, pregnancy rates, and marital function of infertile couples undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016;33(6):689-701. DOI 10.1007/s10815-016-0690-8.
- Zhai Q.Y., Wang J.J., Tian Y., Liu X., Song Z. Review of psychological stress on oocyte and early embryonic development in female mice. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2020;18(1):101. DOI 10.1186/s12958-020-00657-1.
- Zhang S.Y., Wang J.Z., Li J.J., Wei D.L., Sui H.S., Zhang Z.H., Zhou P., Tan J.H. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. *Biol. Reprod.* 2011;84(4):672-681. DOI 10.1095/biolreprod.110.087890.
- Zhao L.H., Cui X.Z., Yuan H.J., Liang B., Zheng L.L., Liu Y.X., Luo M.J., Tan J.H. Restraint stress inhibits mouse implantation: temporal window and the involvement of HB-EGF, estrogen and progesterone. *PLoS One.* 2013;8(11):e80472. DOI 10.1371/journal.pone.0080472.
- Zhao X.Y., Li Z.B., Yuan H.J., Han X., Wu J.S., Feng X.Y., Zhang M., Tan J.H. Restraint stress and elevation of corticotrophin-releasing hormone in female mice impair oocyte competence through activation of the tumour necrosis factor α (TNF- α) system. *Reprod. Fertil. Dev.* 2020;32(9):862-872. DOI 10.1071/RD20002.
- Zhou P., Lian H.Y., Cui W., Wei D.L., Li Q., Liu Y.X., Liu X.Y., Tan J.H. Maternal-restraint stress increases oocyte aneuploidy by impairing metaphase I spindle assembly and reducing spindle assembly checkpoint proteins in mice. *Biol. Reprod.* 2012;86(3):83. DOI 10.1095/biolreprod.111.095281.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 20-015-00162, и бюджетного проекта ФИЦ ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0015.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.01.2022. После доработки 21.03.2022. Принята к публикации 31.03.2022.

Aspects of the rhizospheric microbiota and their interactions with the soil ecosystem

Belkacem El Amrani

Department of Biology, Faculty of Science Dhar El Mehraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fes, Morocco
✉ elamranibelkacem@gmail.com

Abstract. Soil microbial communities play a key role in the evolution of the rhizosphere. In addition, proper exploration of these microbial resources represents a promising strategy that guarantees the health and sustainability of all ecosystems connected to the ground. Under the influence of environmental conditions, microbial communities can change compositions in terms of abundance and diversity. Beyond the descriptive level, the current orientation of microbial ecology is to link these structures to the functioning of ecosystems; specifically, to understand the effect of environmental factors on the functional structure of microbial communities in ecosystems. This review focuses on the main interactions between the indigenous soil microflora and the major constituents of the rhizosphere to understand, on the one hand, how microbial biodiversity can improve plant growth and maintain homeostasis of the rhizospheric ecosystem, on the other hand, how the maintenance and enrichment of plant biodiversity can contribute to the conservation of soil microbial diversity; knowing that these microorganisms are also controlled by the abiotic properties of the soil. Overall, understanding the dynamics of the rhizosphere microbiome is essential for developing innovative strategies in the field of protecting and maintaining the proper functioning of the soil ecosystem.

Key words: soil microorganisms; rhizosphere; microbial diversity; plant biodiversity.

For citation: El Amrani Belkacem. Aspects of the rhizospheric microbiota and their interactions with the soil ecosystem. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):442-448. DOI 10.18699/VJGB-22-54

Аспекты ризосферной микробиоты и их взаимодействие с почвенной экосистемой

Белкасем эль-Амрани

Отделение биологии, факультет наук, Дар-эль-Махраз, Университет им. Сиди Мохаммеда бен Абдаллаха, Фес, Марокко
✉ elamranibelkacem@gmail.com

Аннотация. Почвенные микробные сообщества играют ключевую роль в эволюции ризосферы. Планомерное изучение этих микробных ресурсов представляет собой перспективную стратегию, с помощью которой можно будет обеспечить здоровье и устойчивость всех почвенных экосистем. Под воздействием окружающей среды микробные сообщества могут менять численность своих популяций и видовой состав. Современная микробная экология нацелена, помимо описательного уровня, на определение связей этих структур с функционированием экосистем, в частности для понимания роли окружающей среды в жизнедеятельности микробных сообществ в экосистемах. Настоящий обзор посвящен основным взаимодействиям между местной почвенной микрофлорой и главными составляющими ризосферы. Важно понять, с одной стороны, как микробное биоразнообразие может улучшить рост растений и поддержать гомеостаз ризосферной экосистемы, а с другой – как сохранение и повышение растительного биоразнообразия способствуют сохранению почвенного микробного разнообразия, зная при этом, что данные микроорганизмы контролируются еще и абиотическими свойствами почв. В целом понимание динамики микробиома ризосферы необходимо для разработки инновационных стратегий в области защиты и поддержания надежного функционирования почвенной экосистемы.

Ключевые слова: почвенные микроорганизмы; ризосфера; микробное разнообразие; биоразнообразие растений.

Introduction

The rhizosphere, a narrow area of soil that surrounds the roots of plants, harbors a number of microorganisms that interact with plants and the surrounding soil, and is considered one of the most dynamic interfaces on Earth (Philippot et al., 2013; Kuzyakov, Blagodatskaya, 2015). In addition, since their colonization of terrestrial environments, terrestrial plants have formed symbioses with microorganisms (Fitzpatrick et al., 2018). They have been accompanied by fungi, bacteria, viruses and protists over millions of years, and those associations that allow and accelerate the adaptation of plants to life on Earth (Shekhar et al., 2019).

It has been estimated that the symbiosis between plants and fungi was established early with arbuscular mycorrhizal fungi more than 450 million years ago (Ma) during the colonization of the Earth by plants, as the oldest and the most common symbiotic association of plants with microbes (Field et al., 2015). However, the structure and activity of soil microbial communities are intimately linked to their roles in ecological processes; the identity and abundance of species present in an ecosystem determine the types of interactions in the rhizosphere and subsequently constitute the key elements of the ecological theories (Talbot et al., 2014). In addition, the soil microbiome is divided into two distinct microbial compartments, depending on their position in relation to the roots of plants, the microorganisms surrounding the roots being commonly referred to as rhizospheric or endophytes (Fitzpatrick et al., 2018).

Interactions between the plant and its microbiota range from parasitism to mutualism, and their results can be decisive for the performance of the plant (Almario et al., 2017; El Amrani, Amraoui, 2022). Endophytic soil microorganisms colonize plant roots forming complex communities and perform beneficial functions by improving plant growth, health and defense against enemies. This association improves the adaptation of plants to environmental constraints such as drought and nutrient deficiency (Almario et al., 2017; Shekhar et al., 2019). This beneficial effect of the root microbiota on plants is achieved by the secretion of different growth hormones such as auxin, cytokinin and gibberellic acid, or by reducing the production of ethylene. This leads to the promotion of plant growth by changing the architecture of the root system (Shekhar et al.,

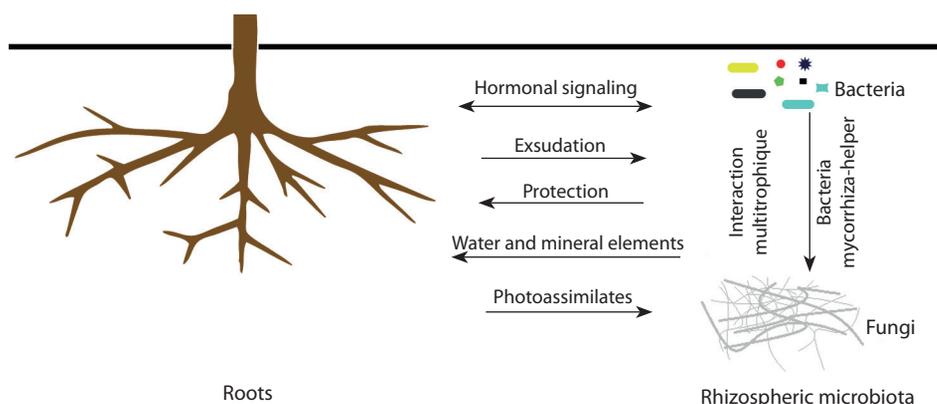
2019; El Amrani, Amraoui, 2020) and also by increasing the acquisition of nutrients (Fitzpatrick et al., 2018).

Thus, the plant microbiota can be considered as an extension of the plant, in the sense that it can increase the plant's access to nutrients in poor soils (Vandenkoornhuysen et al., 2015). It has been estimated that 80 % of vascular plant species receive phosphorus (P) and other nutrients from fungi in exchange for photosynthesis (Almario et al., 2017) (see the Figure). In other words, microbial biodiversity is essential to enhance the sustainable growth of plants through improved nutrition, root architecture, defense mechanisms and the competition with pathogens as well as through participation in the adaptation of plants to abiotic constraints.

The concept of microbial biodiversity

Bacteria are the most diverse organisms among living things (Whitman et al., 1998). Their activity, richness and composition play a major role in the functioning of an ecosystem, either free-living or associated with other host organisms (Walters, Martiny, 2020).

Microbial biodiversity studies use several methods depending on the objective. Species diversity is the most studied concept despite it being a single dimension of biodiversity (Latimer, 2012). This is due to the fact that species is the basic unit of ecology and the evolution of ecosystems, hence the importance of this concept for evaluating and conserving biodiversity. However, definitions and formulas have been developed to fully understand and control microbial communities (Fontana et al., 2020). These notions include the measurement of biodiversity at spatial scales; according to Whittaker (1972), this notion is based on three scopes: (i) alpha diversity refers to the diversity within a particular ecosystem (number or relative abundance of taxa); (ii) beta diversity expresses the total number of species unique to each of the ecosystems compared; it makes it possible to examine the evolution of the diversity of species between several ecosystems; (iii) the total or gamma diversity of a landscape, or geographical area, is the product of the alpha diversity of its communities and the degree of beta differentiation between them. Among these three parameters, alpha diversity is the key element in conservation work because it quantifies the biodiversity of a particular ecosystem through measurement



Schematic of the interactions between roots and soil microbial communities.

based on the notion of presence/absence and abundance of taxa within a local community.

Despite the diversification of these mathematical tools, they fail to reflect the added value of diversity within the ecological whole. In this regard, the notion of functional diversity versus specific diversity appeared (Biswas, Mallik, 2011). This functional diversity is based on a metric for quantifying the diversity of functional traits (Díaz et al., 2007). This calls into question the philosophy of conservation biology, which recognizes that the great diversity of species ensures great functional diversity and maintains the functional stability of the ecosystem (Mayfield et al., 2010).

Factors and interactions of soil microorganisms

Soil microbial communities are vital for an ecosystem to maintain the sustainability of long-term ecological interactions (Chang et al., 2017). They are essential to the plant due to their contribution to its growth, its development and its productivity (Trivedi et al., 2013) through the maintenance of soil fertility thanks to the important roles they play in the availability of nutrients (Chang et al., 2017). Soil microbial communities also play a fundamental role in soil biogeochemical cycles (Rousk, Bengtson, 2014) because the dynamic structure of soil largely depends on the interaction between microbial biology and the roots of plants living in the soil (Jin K. et al., 2013).

However, there are a variety of factors that can significantly affect soil microbial communities and predict the abundance and diversity of these communities. Among these factors, there are biotic factors such as root respiration and the nature of forest formation (Chen et al., 2015b; Schmid et al., 2019); and abiotic factors such as temperature, climate, soil pH, moisture, organic matter also including nutritive elements such as nitrogen and phosphorus (Cao et al., 2016; Wang et al., 2018; Chernov, Zhelezova, 2020). These biotic and abiotic factors are very dynamic and consist of many elements that can interact and influence microbial communities in the soil. Some studies have elucidated that the interaction between microbial communities and soil biotic and abiotic factors functions as an integrated impact of climate-soil-plant factors on the soil microbiome (Jiménez et al., 2019; Pingel et al., 2019). More so, soil microbial communities react primarily in response to changes in plant-soil interactions (Yao et al., 2018). Therefore, these microbial communities are essential in order to maintain homeostasis of the entire rhizospheric ecosystem (Raaijmakers et al., 2009).

Afforestation and soil microorganisms

Afforestation has a very important role in the functioning of rhizospheric ecosystems, it improves soil conditions and promotes soil development, especially in degraded ecosystems with an extremely poor environment (Ren et al., 2017; El Amrani, Amraoui, 2018). In addition, soil microbes react quickly to afforestation, which causes a huge increase in microbial proliferation (van der Wal et al., 2006). Dominant bacterial phyla, both Proteobacteria, Bacteroidetes, have been shown to be significantly more abundant in woodland than in abandoned land (Baldrian, 2017; Ren et al., 2018). In addition, the development of fungal communities also shows a significant increase after afforestation (Wallander et al., 2013; Gunina

et al., 2017) in response to the improvement of the chemical properties of the soil as in the case of the conversion of abandoned land into forest (Yang et al., 2018).

However, natural forest ecosystems maintain greater soil microbial diversity than monoculture afforestation (Monkai et al., 2018). Some studies have shown that Ascomycota responded positively to land use change while Basidiomycota responded negatively (Ren et al., 2018). Also, ecosystems that contain a mixture of different plant genera have the potential to exhibit greater microbial community heterogeneity than single species plantations (Carnovale et al., 2019). From this proposition, it can be concluded that changes due to afforestation type may be related mainly to fungal phyla. Finally, this shows that maintaining the variability of plant species during afforestation greatly contributes to the conservation of the microbial diversity of the soil.

Plant species and soil microorganisms

The effect of afforestation on microbial communities may be due to the nature and diversity of plant species. In addition, plant species have been shown to significantly influence the composition and microbial structure of the soil (Yang et al., 2018). Therefore, the structure and function of the soil microbial community are often shown to be spatially associated with the composition, richness and biomass of plant communities (Gömöryová et al., 2013; Carnovale et al., 2019), as well as with stages of plant growth (Sheng et al., 2017). In addition, it has been believed that the soil microbiota responds quickly to variations in plant species (Yang et al., 2018) due to direct interaction between plant roots and soil microorganisms (Gömöryová et al., 2013). But this effect is not homogeneous and it is more pronounced on fungal communities than on bacterial communities (Carnovale et al., 2019). However, in addition to the direct effect of plant species on soil microbial communities, the structure and function of plant communities can indirectly influence (inhibit or stimulate) these microbial communities by altering the physical and chemical properties of the soil (Shen et al., 2013; El Amrani, 2017; Yang et al., 2018). Therefore, plant roots exert a strong impact on soil pathogens and beneficial microorganisms in the rhizosphere by producing exudates as well as secondary metabolites (Feng et al., 2019). Therefore, the enrichment of plant biodiversity plays a vital role in maintaining the microbial composition of the soil, which is not the case with monocultures. This conclusion is confirmed by the works of Schmid et al. (2019) who has tested, over the course of 11 years, soil bacterial communities developed under plant monocultures and mixtures. These works confirm that richness in plant species positively affects the composition and diversity of microbial communities.

Rhizospheric bacterial communities are considered cosmopolitan and colonize all biogeographical regions (Hanson et al., 2012). However, their activities and their diversities as well as their distributions are controlled by several parameters of the environment; among these factors, the plant figures as the major factor that controls them (Kumar et al., 2017). Some research has found conflicting results regarding prediction of microbial diversity by plant diversity when examining their relationships at large spatial scales (Liu et al., 2020). However, microbial communities are composed of groups that differ in their behavior. In this regard, we cite the obligate pathogenic

or symbiotic microorganisms, the life cycles of which can only be completed in the presence of their specific host such as obligate endophytes (Sally, David, 2008; Nair, Padmavathy, 2014; Glick, 2020). Another example can be seen in the case of ectomycorrhizae, most of which present host-symbiont specificity (Kernaghan et al., 2003). According to these two examples, we can only admit that parental control exerted by plant diversity influences the activity and microbial diversity of the rhizosphere. However, the degree of this control differs by several parameters mainly including the nature of microbial groups, plant species, and also soil and climatic conditions (Bargali et al., 2018; D'Acunto et al., 2018; Malard, Pearce, 2018). This explains the sometimes modest correlations between microbial richness and plant diversity (Liu et al., 2020).

Bulgarelli et al. (2015) used the term 'domestication' of bacterial communities by plant roots to explain the dominance of three bacterial families Comamonadaceae, Flavobacteriaceae and Rhizobiaceae in the barley root microbiota. On the other hand, a broad conservation of the composition of the root bacterial microbiota has been found in *Arabidopsis thaliana* and related species extending over 35 Ma within the family Brassicaceae (Schlaeppli et al., 2014). These results mean that the host plant determines and maintains its bacterial procession. This control of the soil microbial diversity by the plants is carried out mainly by the process of rhizodeposition (root excretion of photosynthesis-derived organic compounds) (Jones et al., 2009). These exudates can influence this microbial community either through trophic selection (trophic substances used by specific microbial groups) (Mansouri et al., 2002), biochemical selection (substances that stimulate or inhibit the proliferation of a given microbial group) (Rosier et al., 2018) or by chemotaxis (substances that attract targeted microbial groups to the roots of the plant) (Scharf et al., 2016).

Litter and soil microorganisms

The main methods by which plant communities affect soil chemical properties and subsequently microbial communities are primarily root and leaf litter, and root exudates (Zverev et al., 2016). Trees produce the majority of the waste deposited on the ground, in addition to a very large part of root exudates and dead roots under the ground (Gömöryová et al., 2013), which provides different inputs in quantity and quality (Yao et al., 2018). It is essential to claim that trees influence the soil microbiota basically in the same way as other plants, but their effect is potentially stronger due to the greater input biomass (Gömöryová et al., 2013). Therefore, the difference in the quantity and quality of litter and exudate inputs, different species and plant communities, modulates and causes a change in soil microbial communities (Santonja et al., 2018) even at the regional scale (Chen et al., 2015a).

Likewise, several previous studies have reported that differences in litter quality between tree species affect the abundance and composition of bacterial and fungal communities in the soil (Santonja et al., 2018; Pingel et al., 2019). In addition, differences in the quality of the litter occur in the nature of the inputs; such as the leaching of dissolved organic matter and nutrients, and the exudation of different kinds of ions and organic compounds (Yang et al., 2018). These variations can alter the rate and speed of fundamental soil processes, such as nutrient cycling and carbon dynamics, differently (Carnovale

et al., 2019). Consequently, the greatest effect of plant species on the chemical properties of the soil is observed in the topsoil corresponding to the greatest amount of organic matter introduced (Kooch et al., 2017). From these results, it is clear that the quality and quantity of litter entering the soil are a determining factor in the existence of microbial communities and needs to be further investigated.

Secondary metabolites and soil microorganisms

Secondary metabolites are another component of plant litter of particular interest to soil ecosystems and exert a major effect on their edaphic microflora, especially in forest soils where complex phenol content is significantly higher (Yang et al., 2018). Similarly, Santonja et al. (2018) showed a contrasting activity of bacterial and fungal communities in response to the diversity of plant litter in a Mediterranean forest. These authors and others have shown that secondary metabolites repress biomass and the activity of microbial communities (Chomel et al., 2016; Santonja et al., 2018). Likewise, Chomel et al. (2014) showed a strong inhibitory effect of phenolic compounds, depending on the concentration, on fungal biomass in a Mediterranean pine forest. On the other hand, Amaral and Knowles (1998) reported the presence of monoterpenes negatively affecting the growth and activity of certain soil microbial groups while having a positive effect on other groups. However, knowledge of the effects of secondary metabolites on the activity and richness of soil microbial communities is still very limited.

Soil pH and microorganism communities

The change in pH is also a consequence of the biogeochemical interaction and has a major effect on the composition and activity of the soil microbial community. Therefore, the pH represents the primary metabolic control of microbial communities (Zhalnina et al., 2015). This control can be direct, by modulating the thermodynamics and kinetics of redox reactions and microbial respiration thereafter; or indirect by determining salinity and nutrient bioavailability through determination of proton chemical activity, mineral dissolution and precipitation, and other geochemical reactions (Bethke et al., 2011). On the other hand, soil pH describes the extracellular enzymatic activities and the rate of decomposition of organic matter (Jin Q., Kirk, 2018).

It has been reported that changes in the composition and diversity of microbial communities are positively correlated with variation in soil pH and that this variation controls their spatial distribution in the rhizosphere (Shen et al., 2013). This distribution was lower in monoculture plantations than in natural forests (Monkai et al., 2018). As reported in the study of Chen et al. (2015b), soil acidification decreased soil microbial respiration in forest ecosystems. These results suggest that reducing soil pH can lead to decreased biodiversity, rates of biogeochemical cycling, and ecosystem functioning (Chen et al., 2015b). Unlike bacterial communities, soil acidification has a slightly favorable effect on the richness of fungi in forest ecosystems (Rousk et al., 2011). Thus, the advanced knowledge of these interactions (pH-fungi-bacteria) can be a very powerful tool to mitigate negative effects caused by pathogenic fungi or bacteria by increasing or decreasing soil acidity.

Climate and soil microorganisms

The climatic conditions of soil ecosystems constitute one of the most determining parameters of the distribution of microbial communities. Previous research has confirmed that the spatial variation of soil microbial biomass depends on the spatial heterogeneity of climatic conditions (Xu et al., 2018). This justifies the use of microbiological properties as better indicators of soil quality, in particular the great capacity of microbial communities to react quickly to environmental changes (Marinari et al., 2006). As an example, several studies have reported that the mean annual temperature and mean annual precipitation show a positive correlation with microbial abundance and diversity (Cao et al., 2016; Tu et al., 2016). Also, low soil moisture and dry conditions during the summer drought period have a negative effect on microbial diversity and richness. These types of conditions can make a specific selection through the selection of drought resistant taxa such as fungi with lower nutritional requirements and higher water acquisition capacity or Gram positive bacteria (Manzoni et al., 2012; Xi et al., 2018).

From these results and the fact that soils belonging to the same climatic types have similar properties, we can conclude that climatic factors are of great importance for biodiversity and the richness of microbial biomass in the soil. It also suggests that soil microbes could be used as a more precise indicator of soil ecosystem characteristics.

Soil depth and soil microorganisms

Little is known about the effects of the physical properties of soil on the plant-microorganism interaction. However, the physical properties of soil have been reported to cause profound changes in soil microbial communities (Thoms et al., 2010; Xu et al., 2018). In addition to the physical properties of soil, the biomass and activities of fungal and bacterial communities also change at different depths of the soil profile (Carnovale et al., 2019). This vertical distribution reveals that fungi predominate in the topsoil of the soil, generally between 0 and 10 cm deep, and bacteria and actinomycetes predominate deep soils between 40 and 100 cm deep (Yao et al., 2018).

Nevertheless, it remains necessary to understand how physical properties, especially mechanical ones, can influence the microbiome residing in the soil and what mechanisms the microbiome can use to combat these types of stresses.

Conclusion

Microbial biodiversity is essential for improving sustainable plant growth and maintaining homeostasis of the entire rhizospheric ecosystem. In return, maintaining and enriching plant biodiversity greatly contributes to the conservation of soil microbial diversity. However, this balance depends and/or at the same time affects the biogeochemical cycle of the soil. Taken together, these interactions explain the complexity of understanding the dynamics of the rhizospheric microbiome. Hence the importance of such a study that could inform future work aimed at researching the interactions between microbial communities and other soil components in order to improve the management of resources and the productivity of rhizospheric ecosystems.

References

- Almarino J., Jeena G., Wunder J., Langen G., Zuccaro A., Coupland G., Bucher M. Root-associated fungal microbiota of nonmycorrhizal *Arabidopsis thaliana* and its contribution to plant phosphorus nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017;114:E9403-E9412. DOI 10.1073/pnas.1710455114.
- Amaral J.A., Knowles R. Inhibition of methane consumption in forest soils by monoterpenes. *J. Chem. Ecol.* 1998;24:723-734. DOI 10.1023/A:1022398404448.
- Baldrian P. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017;41(2):109-130. DOI 10.1093/femsre/fuw040.
- Bargali K., Manral V., Padalia K., Bargali S.S., Upadhyay V.P. Effect of vegetation type and season on microbial biomass carbon in Central Himalayan forest soils, India. *CATENA.* 2018;171:125-135. DOI 10.1016/j.catena.2018.07.001.
- Bethke C.M., Sanford R.A., Kirk M.F., Jin Q., Flynn T.M. The thermodynamic ladder in geomicrobiology. *Am. J. Sci.* 2011;311(3):183-210. DOI 10.2475/03.2011.01.
- Biswas S.R., Mallik A.U. Species diversity and functional diversity relationship varies with disturbance intensity. *Ecosphere.* 2011;2(4):1-10. DOI 10.1890/ES10-00206.1.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P.C., Weiman A., Dröge J., Pan Y., McHardy A.C., Schulze-Lefert P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe.* 2015;17(3):392-403. DOI 10.1016/j.chom.2015.01.011.
- Cao H., Chen R., Wang L., Jiang L., Yang F., Zheng S., Wang G., Lin X. Soil pH, total phosphorus, climate and distance are the major factors influencing microbial activity at a regional spatial scale. *Sci. Rep.* 2016;6:25815. DOI 10.1038/srep25815.
- Carnovale D., Bissett A., Thrall P.H., Baker G. Plant genus (*Acacia* and *Eucalyptus*) alters soil microbial community structure and relative abundance within revegetated shelterbelts. *Appl. Soil Ecol.* 2019; 133:1-11. DOI 10.1016/j.apsoil.2018.09.001.
- Chang E.-H., Tian G., Chiu C.-Y. Soil microbial communities in natural and managed cloud montane forests. *Forests.* 2017;8(2):33. DOI 10.3390/f8010033.
- Chen D., Mi J., Chu P., Cheng J., Zhang L., Pan Q., Xie Y., Bai Y. Patterns and drivers of soil microbial communities along a precipitation gradient on the Mongolian Plateau. *Landsc. Ecol.* 2015a;30:1669-1682. DOI 10.1007/s10980-014-9996-z.
- Chen D., Wang Y., Lan Z., Li J., Xing W., Hu S., Bai Y. Biotic community shifts explain the contrasting responses of microbial and root respiration to experimental soil acidification. *Soil Biol. Biochem.* 2015b;90:139-147. DOI 10.1016/j.soilbio.2015.08.009.
- Chernov T.I., Zhelezova A.D. The dynamics of soil microbial communities on different timescales: a review. *Eurasian Soil Sci.* 2020;53: 643-652. DOI 10.1134/S106422932005004X.
- Chomel M., Fernandez C., Bousquet-Mélou A., Gers C., Monnier Y., Santonja M., Gauquelin T., Gros R., Lecareux C., Baldy V. Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. *J. Ecol.* 2014;102(2):411-424. DOI 10.1111/1365-2745.12205.
- Chomel M., Guittonny-Larchevêque M., Fernandez C., Gallet C., DesRochers A., Paré D., Jackson B.G., Baldy V. Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *J. Ecol.* 2016;104(6):1527-1541. DOI 10.1111/1365-2745.12644.
- D'Acunto L., Andrade J.F., Poggio S.L., Semmartin M. Diversifying crop rotation increased metabolic soil diversity and activity of the microbial community. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018;257:159-164. DOI 10.1016/j.agee.2018.02.011.
- Díaz S., Lavorel S., de Bello F., Quétier F., Grigulis K., Robson T.M. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007;104(52):20684-20689. DOI 10.1073/pnas.0704716104.

- El Amrani B. The effect of pH on the growth of *Cedrus atlantica* M. plants. 1st Scientific Day dedicated to PhD students under the theme "Biotechnology, Ecology and Valorization of Phyto-resources" FSDM, Fes, Morocco. 2017. DOI 10.5281/zenodo.619302.
- El Amrani B., Amraoui B.M. Effects of some properties of cedar forest soils on secondary roots of *Cedrus atlantica* Manetti. *J. For. Sci.* 2018;64:506-513. DOI 10.17221/69/2018-JFS.
- El Amrani B., Amraoui B.M. Biomechanics of Atlas cedar roots in response to the medium hydromechanical characteristics. *Scientifica.* 2020;2020:7538698. DOI 10.1155/2020/7538698.
- El Amrani B., Amraoui B.M. Soil microbial communities affect development of *Cedrus atlantica* M. *Asian J. Soil Sci. Plant Nutr.* 2022;7(1):43-50.
- Feng Y., Hu Y., Wu J., Chen J., Yrjälä K., Yu W. Change in microbial communities, soil enzyme and metabolic activity in a *Torreya grandis* plantation in response to root rot disease. *For. Ecol. Manag.* 2019;432:932-941. DOI 10.1016/j.foreco.2018.10.028.
- Field K.J., Leake J.R., Tille S., Allinson K.E., Rimington W.R., Bidartondo M.I., Beerling D.J., Cameron D.D. From mycoheterotrophy to mutualism: mycorrhizal specificity and functioning in *Ophioglossum vulgatum* sporophytes. *New Phytol.* 2015;205:1492-1502. DOI 10.1111/nph.13263.
- Fitzpatrick C.R., Copeland J., Wang P.W., Guttman D.S., Kotanen P.M., Johnson M.T.J. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018;115(6):E1157-E1165. DOI 10.1073/pnas.1717617115.
- Fontana V., Guariento E., Hilpold A., Niedrist G., Steinwandter M., Spitale D., Nascimbene J., Tappeiner U., Seeber J. Species richness and beta diversity patterns of multiple taxa along an elevational gradient in pastured grasslands in the European Alps. *Sci. Rep.* 2020;10:12516. DOI 10.1038/s41598-020-69569-9.
- Glick B.R. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer Cham, 2020. DOI 10.1007/978-3-030-44368-9.
- Gömöryová E., Ujházy K., Martinák M., Gömöry D. Soil microbial community response to variation in vegetation and abiotic environment in a temperate old-growth forest. *Appl. Soil Ecol.* 2013;68:10-19. DOI 10.1016/j.apsoil.2013.03.005.
- Gunina A., Smith A.R., Godbold D.L., Jones D.L., Kuzyakov Y. Response of soil microbial community to afforestation with pure and mixed species. *Plant Soil.* 2017;412:357-368. DOI 10.1007/s11104-016-3073-0.
- Hanson C.A., Fuhrman J.A., Horner-Devine M.C., Martiny J.B.H. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10:497-506. DOI 10.1038/nrmicro2795.
- Jiménez J.J., Igual J.M., Villar L., Benito-Alonso J.L., Abadias-Ullod J. Hierarchical drivers of soil microbial community structure variability in "Monte Perdido" Massif (Central Pyrenees). *Sci. Rep.* 2019;9(1):8768. DOI 10.1038/s41598-019-45372-z.
- Jin K., Shen J., Ashton R.W., Dodd I.C., Parry M.A.J., Whalley W.R. How do roots elongate in a structured soil? *J. Exp. Bot.* 2013;64(15):4761-4777. DOI 10.1093/jxb/ert286.
- Jin Q., Kirk M.F. pH as a primary control in environmental microbiology: 1. Thermodynamic perspective. *Front. Environ. Sci.* 2018;6:21. DOI 10.3389/fenvs.2018.00021.
- Jones D.L., Nguyen C., Finlay R.D. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil.* 2009;321:5-33. DOI 10.1007/s11104-009-9925-0.
- Kernaghan G., Widden P., Bergeron Y., Légaré S., Paré D. Biotic and abiotic factors affecting ectomycorrhizal diversity in boreal mixed-woods. *Oikos.* 2003;102:497-504.
- Kooch Y., Samadzadeh B., Hosseini S.M. The effects of broad-leaved tree species on litter quality and soil properties in a plain forest stand. *CATENA.* 2017;150:223-229. DOI 10.1016/j.catena.2016.11.023.
- Kumar M., Brader G., Sessitsch A., Mäki A., van Elsland J.D., Nissinen R. Plants assemble species specific bacterial communities from common core taxa in three arcto-alpine climate zones. *Front. Microbiol.* 2017;8:12. DOI 10.3389/fmicb.2017.00012.
- Kuzyakov Y., Blagodatskaya E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 2015;83:184-199. DOI 10.1016/j.soilbio.2015.01.025.
- Latimer A.M. Species diversity. In: El-Shaarawi A.H., Piegorsch W.W. (Eds.) *Encyclopedia of Environmetrics.* Wiley, 2012. DOI 10.1002/9780470057339.vas046.pub2.
- Liu L., Zhu K., Wurzbürger N., Zhang J. Relationships between plant diversity and soil microbial diversity vary across taxonomic groups and spatial scales. *Ecosphere.* 2020;11(1):e02999. DOI 10.1002/ecs2.2999.
- Malard L.A., Pearce D.A. Microbial diversity and biogeography in Arctic soils: microbial diversity and biogeography. *Environ. Microbiol. Rep.* 2018;10:611-625. DOI 10.1111/1758-2229.12680.
- Mansouri H., Petit A., Oger P., Dessaux Y. Engineered rhizosphere: the trophic bias generated by opine-producing plants is independent of the opine type, the soil origin, and the plant species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002;68(5):2562-2566. DOI 10.1128/AEM.68.5.2562-2566.2002.
- Manzoni S., Schimel J.P., Porporato A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. *Ecology.* 2012;93(4):930-938. DOI 10.1890/11-0026.1.
- Marinari S., Mancinelli R., Campiglia E., Grego S. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecol. Indic.* 2006;6(4):701-711. DOI 10.1016/j.ecolind.2005.08.029.
- Mayfield M.M., Bonser S.P., Morgan J.W., Aubin I., McNamara S., Vesk P.A. What does species richness tell us about functional trait diversity? Predictions and evidence for responses of species and functional trait diversity to land-use change. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 2010;19(4):423-431. DOI 10.1111/j.1466-8238.2010.00532.x.
- Monkai J., Goldberg S.D., Hyde K.D., Harrison R.D., Mortimer P.E., Xu J. Natural forests maintain a greater soil microbial diversity than that in rubber plantations in Southwest China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2018;265:190-197. DOI 10.1016/j.agee.2018.06.009.
- Nair D.N., Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *Sci. World J.* 2014;2014:250693. DOI 10.1155/2014/250693.
- Philippot L., Raaijmakers J.M., Lemanceau P., van der Putten W.H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013;11:789-799. DOI 10.1038/nrmicro3109.
- Pingel M., Reineke A., Leyer I. A 30-years vineyard trial: plant communities, soil microbial communities and litter decomposition respond more to soil treatment than to N fertilization. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2019;272:114-125. DOI 10.1016/j.agee.2018.11.005.
- Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moënne-Loccoz Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil-borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil.* 2009;321:341-361. DOI 10.1007/s11104-008-9568-6.
- Ren C., Chen J., Deng J., Zhao F., Han X., Yang G., Tong X., Feng Y., Shelton S., Ren G. Response of microbial diversity to C:N:P stoichiometry in fine root and microbial biomass following afforestation. *Biol. Fertil. Soils.* 2017;53:457-468. DOI 10.1007/s00374-017-1197-x.
- Ren C., Wang T., Xu Y., Deng J., Zhao F., Yang G., Han X., Feng Y., Ren G. Differential soil microbial community responses to the linkage of soil organic carbon fractions with respiration across land-use changes. *For. Ecol. Manag.* 2018;409:170-178. DOI 10.1016/j.foreco.2017.11.011.
- Rosier A., Medeiros F.H.V., Bais H.P. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant Soil.* 2018;428:35-55. DOI 10.1007/s11104-018-3679-5.
- Rousk J., Bengtson P. Microbial regulation of global biogeochemical cycles. *Front. Microbiol.* 2014;5:103. DOI 10.3389/fmicb.2014.00103.
- Rousk J., Brookes P.C., Bååth E. Fungal and bacterial growth responses to N fertilization and pH in the 150-year 'Park Grass' UK grassland experiment: N and pH influence on microbial growth in grass-

- land soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011;76(1):89-99. DOI 10.1111/j.1574-6941.2010.01032.x.
- Sally E.S., David R. Mycorrhizal Symbiosis. Elsevier, 2008. DOI 10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6.
- Santonja M., Foucault Q., Rancon A., Gauquelin T., Fernandez C., Baldy V., Mirleau P. Contrasting responses of bacterial and fungal communities to plant litter diversity in a Mediterranean oak forest. *Soil Biol. Biochem.* 2018;125:27-36. DOI 10.1016/j.soilbio.2018.06.020.
- Scharf B.E., Hynes M.F., Alexandre G.M. Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant Mol. Biol.* 2016;90:549-559. DOI 10.1007/s11103-016-0432-4.
- Schlaeppli K., Dombrowski N., Oter R.G., Ver Loren van Themaat E., Schulze-Lefert P. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111(2):585-592. DOI 10.1073/pnas.1321597111.
- Schmid M.W., Hahl T., van Moorsel S.J., Wagg C., De Deyn G.B., Schmid B. Feedbacks of plant identity and diversity on the diversity and community composition of rhizosphere microbiomes from a long-term biodiversity experiment. *Mol. Ecol.* 2019;28:863-878. DOI 10.1111/mec.14987.
- Shekhar V., Stöckle D., Thellmann M., Vermeer J.E.M. The role of plant root systems in evolutionary adaptation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2019;131:55-80. DOI 10.1016/bs.ctdb.2018.11.011.
- Shen C., Xiong J., Zhang H., Feng Y., Lin X., Li X., Liang W., Chu H. Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biol. Biochem.* 2013;57:204-211. DOI 10.1016/j.soilbio.2012.07.013.
- Sheng M., Chen X., Zhang X., Hamel C., Cui X., Chen J., Chen H., Tang M. Changes in arbuscular mycorrhizal fungal attributes along a chronosequence of black locust (*Robinia pseudoacacia*) plantations can be attributed to the plantation-induced variation in soil properties. *Sci. Total Environ.* 2017;599-600:273-283. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.04.199.
- Talbot J.M., Bruns T.D., Taylor J.W., Smith D.P., Branco S., Glassman S.I., Erlandson S., Vilgalys R., Liao H.-L., Smith M.E., Peay K.G. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014;111:6341-6346. DOI 10.1073/pnas.1402584111.
- Thoms C., Gattinger A., Jacob M., Thomas F.M., Gleixner G. Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biol. Biochem.* 2010;42(9):1558-1565. DOI 10.1016/j.soilbio.2010.05.030.
- Trivedi P., Anderson I.C., Singh B.K. Microbial modulators of soil carbon storage: integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends Microbiol.* 2013;21(12):641-651. DOI 10.1016/j.tim.2013.09.005.
- Tu Q., Deng Y., Yan Q., Shen L., Lin L., He Z., Wu L., Van Nostrand J.D., Buzzard V., Michaletz S.T., Enquist B.J., Weiser M.D., Kaspari M., Waide R.B., Brown J.H., Zhou J. Biogeographic patterns of soil diazotrophic communities across six forests in the North America. *Mol. Ecol.* 2016;25(12):2937-2948. DOI 10.1111/mec.13651.
- van der Wal A., van Veen J.A., Smant W., Boschker H.T.S., Bloem J., Kardol P., van der Putten W.H., de Boer W. Fungal biomass development in a chronosequence of land abandonment. *Soil Biol. Biochem.* 2006;38(1):51-60. DOI 10.1016/j.soilbio.2005.04.017.
- Vandenkoornhuise P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 2015;206(4):1196-1206. DOI 10.1111/nph.13312.
- Wallander H., Ekblad A., Godbold D.L., Johnson D., Bahr A., Baldrian P., Björk R.G., Kieliszewska-Rokicka B., Kjoller R., Kraigher H., Plassard C., Rudawska M. Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils – a review. *Soil Biol. Biochem.* 2013;57:1034-1047. DOI 10.1016/j.soilbio.2012.08.027.
- Walters K.E., Martiny J.B.H. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS One.* 2020;15:e0233872. DOI 10.1371/journal.pone.0233872.
- Wang H.H., Chu H.L., Dou Q., Xie Q.Z., Tang M., Sung C.K., Wang C.Y. Phosphorus and nitrogen drive the seasonal dynamics of bacterial communities in pinus forest rhizospheric soil of the Qinling Mountains. *Front. Microbiol.* 2018;9:1930. DOI 10.3389/fmicb.2018.01930.
- Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95(12):6578-6583. DOI 10.1073/pnas.95.12.6578.
- Whittaker R.H. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon.* 1972;21:213-251. DOI 10.2307/1218190.
- Xi N., Chu C., Bloor J.M.G. Plant drought resistance is mediated by soil microbial community structure and soil-plant feedbacks in a savanna tree species. *Environ. Exp. Bot.* 2018;155:695-701. DOI 10.1016/j.envexpbot.2018.08.013.
- Xu Z., Yu G., Zhang X., He N., Wang Q., Wang S., Xu X., Wang R., Zhao N. Biogeographical patterns of soil microbial community as influenced by soil characteristics and climate across Chinese forest biomes. *Appl. Soil Ecol.* 2018;124:298-305. DOI 10.1016/j.apsoil.2017.11.019.
- Yang N., Ji L., Salahuddin Y., Yang L. The influence of tree species on soil properties and microbial communities following afforestation of abandoned land in northeast China. *Eur. J. Soil Biol.* 2018;85:73-78. DOI 10.1016/j.ejsobi.2018.01.003.
- Yao X., Zhang N., Zeng H., Wang W. Effects of soil depth and plant–soil interaction on microbial community in temperate grasslands of northern China. *Sci. Total Environ.* 2018;630:96-102. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.02.155.
- Zhalnina K., Dias R., de Quadros P.D., Davis-Richardson A., Camargo F.A.O., Clark I.M., McGrath S.P., Hirsch P.R., Triplett E.W. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microb. Ecol.* 2015;69(2):395-406. DOI 10.1007/s00248-014-0530-2.
- Zverev A.O., Pershina E.V., Provorov N.A., Andronov E.E., Erikova E.N. Metagenomic characteristic of rhizosphere effect on cereals in black and sod-podzolic soils. *Agric. Biol.* 2016;51(5):654-663. DOI 10.15389/agrobiol.2016.5.654eng.

ORCID ID

Belkacem El Amrani orcid.org/0000-0002-8969-199X

Acknowledgements. To the person who pushed me to write this article.**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Received December 9, 2021. Revised May 26, 2022. Accepted May 28, 2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Селективное культивирование бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью из донных осадков реки Оби в Западной Сибири

А.Л. Герасимчук¹✉, Д.А. Ивасенко^{1, 2}, А.А. Касымова¹, Ю.А. Франк^{1, 2}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

² ООО «Дарвин», Томск, Россия

✉ gerasimchuk_ann@mail.ru

Аннотация. Бактерии играют ключевую роль в биогеохимических циклах природных и антропогенных экосистем. В речных экосистемах бактерии, как правило, интенсивно заселяют илистые отложения. Микроорганизмы имеют важное значение в преобразовании энергии и биотрансформации органических веществ. В связи с этим донные отложения, богатые органикой, могут являться источником выделения метаболически разнообразных микроорганизмов, в том числе перспективных для промышленных биотехнологий. Целью данного исследования было выделение и изучение чистых культур микроорганизмов – продуцентов промышленно значимых ферментов и деструкторов органических веществ из донных осадков р. Оби. В качестве субстратов для выделения накопительных и чистых культур использовали свиной жир и дизельное топливо для селективного культивирования бактерий с липолитической и углеводородокисляющей активностью. Всего получена 21 чистая культура. Филогенетическое положение бактериальных изолятов определено на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК. Выделенные на селективных средах штаммы оказались представителями родов *Pseudomonas* и *Aeromonas* класса *Gammaproteobacteria* и рода *Microvirgula* класса *Betaproteobacteria*. Изучена способность штаммов к росту на плотных питательных средах со свиным жиром, оливковым маслом и дизельным топливом. Липолитическая активность штаммов подтверждена культивированием на диагностической среде с трибутирином. Обнаруженное в ходе исследований филогенетическое и метаболическое разнообразие культивируемых непатогенных бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью указывает на биотехнологический потенциал выделенных нами изолятов. Наиболее перспективными оказались штаммы *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5K3, которые не только проявили липолитическую активность на диагностической среде с трибутирином в широком диапазоне температур, но и утилизировали такие сложные органические субстраты, как дизельное топливо, свиной жир и оливковое масло. Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы; филогенетическое разнообразие; продуценты; липолитическая активность; органические субстраты; биотехнологический потенциал.

Для цитирования: Герасимчук А.Л., Ивасенко Д.А., Касымова А.А., Франк Ю.А. Селективное культивирование бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью из донных осадков реки Оби в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):449-457. DOI 10.18699/VJGB-22-55

Selective cultivation of bacterial strains with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing activity from bottom sediments of the Ob River, Western Siberia

A.L. Gerasimchuk¹✉, D.A. Ivashenko^{1, 2}, A.A. Kasymova¹, Yu.A. Frank^{1, 2}

¹ Tomsk State University, Tomsk, Russia

² Darwin LLC, Tomsk, Russia

✉ gerasimchuk_ann@mail.ru

Abstract. Bacteria play a key role in biogeochemical cycles in natural and anthropogenic ecosystems. In river ecosystems, bacteria intensively colonize silt sediments. Microorganisms are essential for energy conversion, biogeochemical nutrient cycling, pollutant degradation, and biotransformation of organic matter; therefore, bottom sediments can be a source of metabolically diverse microorganisms, including those with promise for industrial biotechnologies. The aim of this work was to isolate and study pure cultures of microorganisms – producers of industrially important enzymes and decomposers of organic matter – from bottom sediments of the Ob River. Pork fat and diesel fuel were used as substrates to obtain enrichment and pure cultures for selective cultivation of bacteria with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing activity. A total of 21 pure cultures were isolated. The phylogenetic position of the obtained bacterial isolates was determined based on the analysis of 16S rRNA gene sequences. The strains isolated on selective media belonged to representatives of the genera *Pseudomonas* and *Aeromonas* (*Gammaproteobacteria*), and the ge-

nus *Microvirgula* (*Betaproteobacteria*). The ability of strains to grow on culture media containing pork fat, olive oil and diesel fuel was analyzed. The lipolytic activity of the isolates was evidenced by cultivation on a diagnostic medium containing 1 % tributyrin. The phylogenetic and metabolic diversity of the cultivated non-pathogenic bacterial strains with lipolytic and oil-oxidizing activity revealed in the study indicates the biotechnological potential of the isolates. The most promising strains were *M. aerodenitrificans* sp. LM1 and *P. lini* sp. KG55K3, which not only exhibited lipolytic activity on the diagnostic medium with tributyrin in a wide temperature range, but also utilized diesel fuel, pork fat and olive oil.

Key words: microorganisms-decomposers; phylogenetic diversity; producers; lipolytic activity; organic substrates; biotechnological potential.

For citation: Gerasimchuk A.L., Ivashenko D.A., Kasymova A.A., Frank Yu.A. Selective cultivation of bacterial strains with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing activity from bottom sediments of the Ob River, Western Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):449-457. DOI 10.18699/VJGB-22-55

Введение

Бактерии играют важную роль в биогеохимических циклах природных и антропогенных экосистем. В речных экосистемах бактерии, как правило, интенсивно заселяют илистые отложения (Araña et al., 2003). Речная микробная сеть представляет собой направленную линейно-разветвленную структуру, сформированную речным потоком. Из толщи воды микроорганизмы переносятся в нижележащие отложения и обогащают их (Brown et al., 2011; De Oliveira, Margis, 2015; Mansour et al., 2018; Wang L. et al., 2018). Разветвленная структура речной экосистемы собирает бактерий с окружающих земель, включая городские и промышленные районы, очистные сооружения сточных вод и сельскохозяйственные угодья, которые тоже поставляют растворимые компоненты (Mansour et al., 2018), такие как органические вещества, питательные вещества или токсичные соединения, в том числе металлы, которые в совокупности определяют активность и численность гетеротрофных бактерий в донных отложениях (Fischer et al., 2002).

Поскольку микроорганизмы имеют большое значение в преобразовании энергии, биогеохимических цикла питательных веществ, деградации загрязнителей и биотрансформации органических веществ, бактерии могут использоваться в качестве биоиндикаторов водных экосистем (Wei et al., 2008; Chen et al., 2018). Например, для представителей *Nitrospirae*, *Betaproteobacteriales*, *Chloroflexi* и *Sphingobacteriales* отмечено увеличение численности пропорционально увеличению количества азота в воде, высокие концентрации которого являются следствием антропогенной нагрузки. Рост доли *Nitrospirae*, *Sphingobacteriales* (*Bacteroidetes*) и *Spirochaetes* и общее снижение численности *Actinobacteria* отмечены в сообществах отложений речных экосистем вблизи очистных сооружений и указывают на влияние сточных вод (Sagova-Mareckova et al., 2021).

Таким образом, характеристика состава бактериальных сообществ в речных отложениях и толще воды, а также соответствующая реакция микробных сообществ на изменение окружающей среды предоставляют ценную информацию, которая помогает исследовать микробные взаимосвязи и оценить экологический риск (Psenner et al., 2008; Wang J. et al., 2016). Кроме того, донные отложения могут быть источником метаболически разнообразных микроорганизмов, в том числе перспективных для промышленных биотехнологий.

Работы, посвященные изучению видового состава и функций микробных сообществ речных экосистем, немногочисленны по сравнению, например, с аналогичными публикациями по экосистемам соленых озер или морей. Микробиологические исследования рек, протекающих по территории России, в большинстве касаются лишь их санитарно-эпидемиологического состояния (Шорникова, 2008). Так, в статье А.И. Копылова и Д.Б. Косолапова (2011) рассмотрено распространение бактериопланктона в нижнем течении р. Оби. Приведены измерения удельной скорости роста, количества и распределения биомассы на разных участках реки (Копылов, Косолапов, 2011). В других работах, связанных с микробиологическим мониторингом Оби, исследованы численность и распространение некоторых метаболических групп микроорганизмов (Savichev et al., 2015), включая устойчивые к антибиотикам и фенолу (Shornikova, Arslanova, 2020). Однако видовое разнообразие и физиологические особенности аборигенной микрофлоры не изучались.

Река Обь, протекающая по территории Западной Сибири, занимает одно из первых мест по протяженности, водоносности и площади водосборного бассейна среди рек Евразии. Из водных бассейнов Сибирского региона для Оби характерны наибольшая антропогенная нагрузка, включая демографическое, сельскохозяйственное и производственное воздействие, и критические показатели качества воды по содержанию некоторых металлов и нефтепродуктов (Koronkevich et al., 2019). В связи с вышеописанным интерес представляет изучение микробных сообществ водной толщи и донных осадков, в том числе с целью поиска биотехнологически перспективных микроорганизмов-деструкторов органического вещества.

Целью данного исследования было выделение чистых культур микроорганизмов-деструкторов из донных осадков реки Оби и изучение их способности утилизировать разные органические субстраты, а также определение липолитической активности при различных условиях культивирования.

Материалы и методы

Пробы донных осадков для исследования были взяты в июле 2020 г. в среднем течении Оби в районе следующих населенных пунктов: Молчаново (57.601429° с. ш., 83.7824851° в. д.), Колпашево (58.30456° с. ш., 82.90774° в. д.), Кargasок (59.06722° с. ш., 80.84963° в. д.). Осадки, представляющие собой песчаные отложения,

отобраны с глубины 1.5 м в стерильные пластиковые пробирки и хранились при +4 °С. Значения рН воды в местах отбора проб были смещены в слабощелочную сторону (от 7.5 до 8.6) (Frank et al., 2021).

Для выделения штаммов-деструкторов органического вещества и продуцентов биотехнологически значимых ферментов применяли подход селективного культивирования с использованием питательных сред для липолитических и нефтеоокисляющих микроорганизмов. Первоначальные накопительные культуры из каждого сайта отбора проб получали на селективной минеральной питательной среде со свиным жиром (1 % от объема среды) в качестве единственного источника углерода (Gerasimchuk et al., 2020) и на среде для нефтеоокисляющих бактерий с добавлением 1 % дизельного топлива, как описано ранее (Франк и др., 2020). Образцы пробы из каждого сайта высевали в количестве 0.5 мл в 50 мл жидкой питательной среды (рН 7.5) со свиным жиром в 120-мл стеклянных флаконах и культивировали при +28 °С в присутствии кислорода. Первый посев для выделения нефтеоокисляющих микроорганизмов проведен методом предельных разведений в 7 мл жидкой среды в стеклянных 15-мл пенициллиновых флаконах. Затем полученные накопительные культуры были посеяны на агаризованные среды с тем же составом для выделения отдельных колоний. Выросшие на чашках с накопительными культурами отдельные колонии пересевались на агаризованный ГРМ-бульон (панкреатический гидролизат рыбной муки – 8 г/л, пептон ферментативный – 8 г/л, хлорид натрия – 4 г/л, рН 7.0–7.4). Дальнейшее культивирование выделенных аэробных штаммов проводили на чашках Петри с агаризованным ГРМ-бульоном при температуре +28 °С.

Морфологию накопительных и чистых культур определяли методом фазово-контрастного микроскопирования (Биомед 6, Россия) с помощью иммерсионного объектива $\times 100$.

Для определения способности штаммов к окислению нефтепродуктов использовали жидкую питательную среду (г/л: KH_2PO_4 – 1.5, K_2HPO_4 – 0.75, NH_4Cl – 1.0, NaCl – 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, дрожжевой экстракт – 0.5) с добавлением 1 % дизельного топлива в качестве органического субстрата. Посевы проводили в 15-мл пенициллиновых флаконах, заполненных средой на одну треть (5 мл). Инкубирование происходило при +28 °С. Рост оценивали по помутнению питательной среды и с помощью микроскопирования. Дополнительно для подтверждения углеводородоокисляющей активности отдельных штаммов были сделаны посевы на плотную минеральную среду без дрожжевого экстракта (Gerasimchuk et al., 2020) в чашках Петри с добавлением 0.1 мл дизельного топлива и распределением вместе с инокулятом по поверхности питательной среды.

Способность утилизировать животный и растительный жир изучали с использованием минеральной питательной среды (Gerasimchuk et al., 2020) с добавлением 1 % свиного жира или 1 % оливкового масла. Культивирование проводили следующим образом: в чашки Петри с 25 мл агаризованной минеральной среды добавляли 0.25 мл расплавленного стерильного свиного жира или оливкового масла, в каплю с жиром помещали инокулят и распреде-

ляли по поверхности агаризованной среды с помощью шпателя или бактериальной петли.

Для определения липолитической активности использовали диагностическую среду (трибутириновый агар), содержащую 0.5 % (w/v) пептона, 0.3 % (w/v) дрожжевого экстракта и 1.5 % бактериологического агара (рН 7.0) с добавлением 1 % трибутирина (Ramnath et al., 2017). Трибутирин – это сложный эфир, состоящий из масляной кислоты и глицерина. Трибутириновый агар классически применяется для демонстрации липолитической активности у бактерий (Mourey, Kilbertus, 1976). Культуры инкубировали при +28, +25 и +4 °С. После 24 или 48 ч инкубации наблюдали зоны гидролиза (прозрачные ореолы) вокруг колоний.

Филогенетическое положение полученных бактериальных штаммов устанавливали с помощью секвенирования и анализа последовательностей генов 16S рРНК. Геномную ДНК из культур выделяли с набором Biolabmix (DU-50) в соответствии с инструкцией производителя (<http://biolabmix.ru/>). Для амплификации бактериальных генов 16S рРНК, которые являются универсальными филогенетическими маркерами, использовали праймеры 27F (DeLong, 1992) и 1492R (Weisburg et al., 1991). ПЦР-смесь объемом 50 мкл содержала 1х ПЦР-буфер (Biolabmix), 2.5 мМ MgCl_2 (Biolabmix), 0.2 мМ смеси dNTP (Biolabmix), по 10 пМ каждого праймера (ООО «Синтол»), 0.7 ед. а. термостабильной HS-Taq-полимеразы (Biolabmix), 3 мкл матрицы ДНК (в концентрации, превышающей 50 нг), до конечного объема доводили стерильной деионизованной водой.

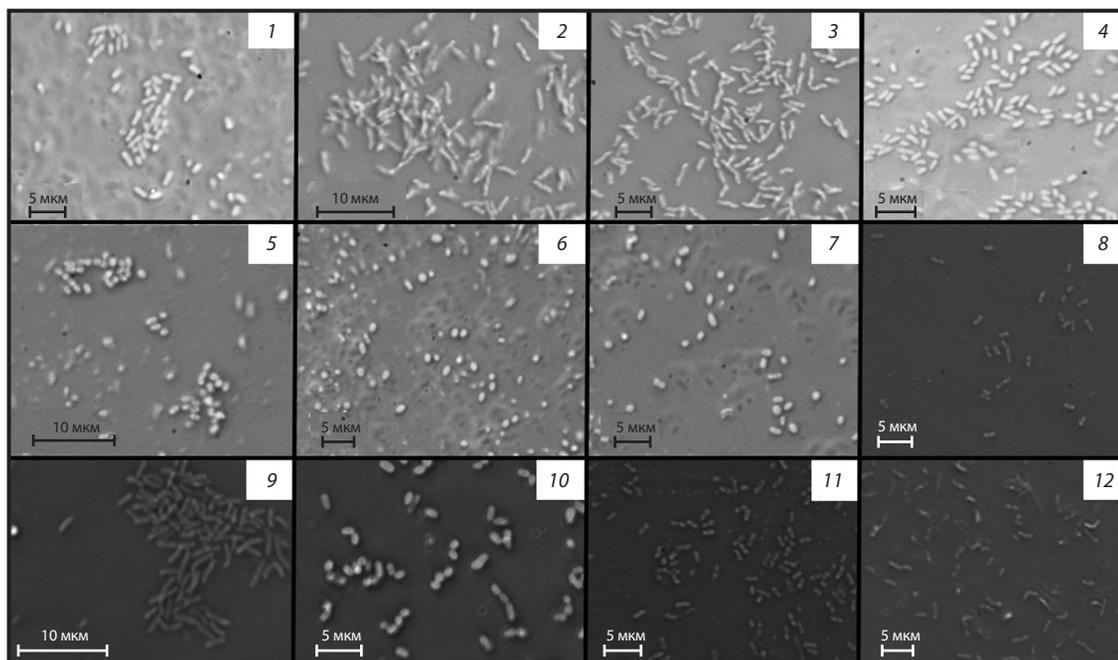
Амплификацию генов 16S рРНК проводили по программе, описанной нами ранее (Герасимчук и др., 2010). Секвенирование выделенных последовательностей ДНК осуществляли с помощью генетического анализатора «НАНОФОР-05» на базе НПФ «Синтол» (Москва). Для получения близкой к полной последовательности гена 16S рРНК выполняли секвенирование с использованием прямого праймера 27F (DeLong, 1992), обратного праймера 1492R (Weisburg et al., 1991) и праймера на середину гена VacV3F (Muyzer et al., 1993).

При анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК применяли редактор последовательностей BIOEDIT (<http://www.jwbrown.mbio.ncsu.edu>), программу BLAST в базе данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и классификатор баз данных SILVA (<http://www.arb-silva/aligner/de>). Для исключения химер последовательности проверяли с использованием веб-инструмента DECIPHER (<http://www2.decipher.codes/FindChimeras.html>). Секвенированные нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу данных GenBank под номерами OM212652, OM212653, OM212656–OM212659, OM212664–OM212671.

Результаты и обсуждение

Получение накопительных и чистых культур

С целью выделения бактериальных штаммов-продуцентов и деструкторов органических веществ использовали образцы донных осадков среднего течения р. Оби и селективные питательные среды для липофильных и нефте-



Микрофотографии чистых культур: 1 – штамм LM7; 2 – штамм LM6; 3 – штамм LM8; 4 – штамм KGS3Ps1; 5 – штамм LK01; 6 – штамм LM3; 7 – штамм LM4; 8 – штамм KGS5k2; 9 – штамм KGS3Ps2; 10 – штамм KGS5k3; 11 – KGS5k1; 12 – штамм LK03.

Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 1000$.

окисляющих микроорганизмов. Из накопительных культур, которые характеризовались высокой численностью и морфологическим разнообразием клеточных форм, были выделены морфологически однородные чистые культуры (см. рисунок). Для дальнейших исследований отобраны штаммы, показавшие стабильный рост на ГРМ-агаре. Всего получено 9 чистых культур из отдельно лежащих колоний, выделенных на среде для нефтеокисляющих бактерий, и 12 чистых культур – на среде для липолитиков.

Филогенетический анализ

Анализ фрагментов генов 16S рРНК показал принадлежность чистых культур к Proteobacteria (классы *Gamma-proteobacteria* и *Betaproteobacteria*) (см. таблицу). Протеобактерии часто являются основными компонентами бактериальных сообществ воды и донных отложений, и доля этого типа в отложениях, как правило, выше, чем в воде (Dai et al., 2016; Zhang et al., 2019).

Большинство проанализированных штаммов оказались представителями *Pseudomonas* и *Aeromonas*, относящихся к классу *Gamma-proteobacteria*. Все полученные и проанализированные фрагменты последовательностей ДНК длиной 677–1445 п. о. демонстрировали высокое сходство (99.48–100 %) с последовательностями типовых штаммов микроорганизмов из базы данных GenBank NCBI.

Некоторые штаммы были родственны условно патогенным микроорганизмам, относящимся к группе риска II в соответствии с классификацией ВОЗ (<https://bacdiv.dsmz.de/>). К обнаруженным патогенам относились все штаммы аэромонад, родственные *A. veronii* (штаммы LKar2 и LKar3), *A. hydrophila* (штаммы LM7 и KLP3), а также *E. coli* (штамм LK01) и *P. putida* (штаммы LM3 и LM4).

Основная часть патогенных штаммов получена из липофильных накопительных культур. Подобный результат, а именно выделение условно патогенных микроорганизмов (энтеробактерий, родственных *Serratia marcescens*, *Leclercia adecarboxylata*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. huaxiensis*, *Enterobacter cloacae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Morganella morganii*) на минеральной среде со свиным жиром, был получен нами ранее при выделении чистых культур липофильных микроорганизмов из очистных сооружений и сточных вод пищевой промышленности (Gerasimchuk et al., 2020). Большое количество патогенов среди липофильных микроорганизмов можно объяснить тем, что, помимо участия в таких метаболических процессах, как гидролиз и модификация липидов, бактериальные липазы могут служить факторами вирулентности у некоторых филогенетических групп (Bender, Flieger, 2010; Kovacic et al., 2019).

Остальные бактерии были родственны микроорганизмам, не являющимся патогенами человека. Большинство штаммов отнесены к роду *Pseudomonas*. Род *Pseudomonas* включает в себя крупную группу грамотрицательных бактерий, которые демонстрируют значительное метаболическое разнообразие, что позволяет им использовать широкий спектр органических соединений и занимать важное экологическое положение в цикле углерода. Псевдомонады распространены повсеместно, встречаются в самых разных экосистемах, среди них много патогенных видов человека, животных и растений (Peix et al., 2009), а также видов-мутуалистов, наиболее яркими примерами которых являются штаммы биоконтроля, защищающие растения от патогенов (Ramette et al., 2011; De Vrieze et al., 2015). Установлено, что виды *Pseudomonas* могут разлагать различные липиды и липид-содержащие соедине-

Филогенетическое положение бактерий, выделенных из донных осадков

Штамм	Номер доступа GenBank	Длина последовательности	Сходство, %	Ближайший валидный родственный организм (GenBank)	Источник выделения	Филогенетическая принадлежность
Чистые культуры, выделенные из липофильных накопительных культур на минеральной среде со свиным жиром						
LM1	OM212667	1364	100	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Nies
LM2	–	613	100			
LM3	–	681	100	<i>Pseudomonas putida</i> (KX083533)	Нет информации	Gam, Pseu
LM4	–	679	100			
LM6	–	617	100	<i>M. aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Neis
LM7	OM212659	680	100	<i>Aeromonas hydrophila</i> (MG428802)	Слизистая оболочка кишечника рыб	Gam, Aero
LM8	OM212666	1407	100	<i>M. aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Neis
LKar2	OM212656	686	100	<i>A. veronii</i> (NR_118947)	Мокрота человека	Gam, Aero
LKar3	OM212658	679	100			
LKol1	–	470	100	<i>Escherichia coli</i> (AP022215)	Сточные воды очистных сооружений	Gam, Enter
LKol2	OM212669	1364	100	<i>M. aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Neis
LKol3	–	621	100			
Чистые культуры, выделенные из накопительных культур на среде с нефтепродуктами						
KGS5k1	OM212664	1413	99.86	<i>P. brassicacearum</i> (KT695825)	Почва США	Gam, Pseu
KGS5k2	–	631	100	<i>P. lini</i> (NR_029042)	Ризосферная почва	
KGS5k3	OM212670	1345	100			
KGS5k8	OM212671	1379	100			
KGS3Ps1	OM212652	1445	100	<i>P. baetica</i> (KU921565)	Осадки озера в Индии	
KGS3Ps2	OM212653	1413	99.83	<i>P. protegens</i> (LS999205)	Почва	
KLP3	OM212657	677	100	<i>A. hydrophila</i> (MT572504)	Загрязненная почва	
Mol4A	OM212665	1108	100	<i>P. veronii</i> (MH669341)	Сосна	
Mol4K12	OM212668	1260	99.92	<i>P. fildesensis</i> (MK859934)/ <i>P. extremaustralis</i> (KX186942)	Антарктическая почва/ пересыхающий водоем	

Примечание. Beta, Nies – *Betaproteobacteria*, *Neisseriales*; Gam, Pseu – *Gammaproteobacteria*, *Pseudomonadales*; Gam, Enter – *Gammaproteobacteria*, *Enterobacteriales*; Gam, Aero – *Gammaproteobacteria*, *Aeromonadales*.

ния (Pabai et al., 1996; Lee, Rhee, 2008; Yang J. et al., 2009; Fendri et al., 2010), а также углеводороды нефти (Barathi, Vasudevan, 2001). Представители рода *Pseudomonas* часто присутствуют в речных экосистемах, что подтверждается как молекулярными исследованиями (Cyriaque et al., 2020), так и культуральными методами (Pellett et al., 1983; Pirnay et al., 2005), включая выделение новых псевдомонад из нефтезагрязненных речных осадков в Китае (Li et al., 2020), загрязненных диоксинами донных отложений в Техасе (Iyer et al., 2017), донных отложений р. Ганг в Индии (Sudan et al., 2018) и т. д.

На основе анализа гена 16S рНК штамм Mol4a показал 100 % сходство с последовательностями из разнообразных местообитаний (активный ил, загрязненные углеводородами подземные воды, загрязненные осадки и др.), обозначенных как *P. veronii*, и 99.82 % – с типовым штаммом

P. veronii, выделенным из минеральных вод (Elomari et al., 1996). Штамм KGS3Ps2 оказался близкородственен выделенному из почвы и стимулирующему рост растений *P. protegens* (LS999205), который вместе с представителями *P. veronii* попадает в группу флуоресцирующих псевдомонад (*Pseudomonas fluorescens* group). К данной таксономической группе относится и *P. baetica*, ген 16S рНК которого на 100 % совпадает с последовательностью штамма KGS3Ps1. Это недавно описанная бактерия, типовой штамм которой является патогеном для камбалы (López et al., 2012).

Штамм KGS5k1 показал наибольшее сходство, 99.86 %, с неописанным штаммом из почвы, обозначенным как *P. brassicacearum* (KT695825), и 99.5 % – с валидным штаммом *P. chlororaphis* (CP027720), выделенным из речной глины и принадлежащим таксономической группе

Pseudomonas chlororaphis group. Штамм Mol4k12 на основе сравнения близкой к полной последовательности гена 16S рРНК продемонстрировал сходство 99.92 % с типовыми штаммами разных видов, а именно *P. fildesensis* (MK859934) и *P. extremaustralis* (KX186942), близкородственных представителям группы флуоресцирующих псевдомонад. Штаммы KGS5k2, KGS5k3 и KGS5k8 имели 100 % гомологию с геном 16S рРНК *P. lini* (NR_029042), выделенной из ризосферной почвы (Delorme et al., 2002).

Род *Pseudomonas* – один из самых сложных в таксономическом отношении (Parte, 2014). Хотя ген 16S рРНК является универсальным филогенетическим маркером в существующей системе классификации бактерий, для дифференцирования близкородственных видов бактерий недостаточно анализа только этого гена. Согласно (Mulet et al., 2012), мультилокусный анализ последовательностей (MLSA), основанный на анализе четырех генов домашнего хозяйства (16S рРНК, *gyrB*, *rpoB* и *rpoD*), позволяет прояснить определение видов и облегчает идентификацию штаммов у *Pseudomonas*. Таким образом, для более точного определения филогенетического положения выделенных штаммов *Pseudomonas* необходимо провести анализ дополнительных филогенетических маркеров (например, генов *gyrB* и *rpoD*).

По результатам анализа последовательностей генов 16S рРНК, штаммы LM1, LM2, LM6, LM8, LK0l2 и LK0l3 оказались идентичны и отнесены к роду *Microvirgula*, представителю класса *Betaproteobacteria*. Надо отметить, что идентичная последовательность длиной 768 п. о. (номер доступа GenBank MT476921), принадлежащая *Microvirgula*, выделена нами ранее из отходов пищевой промышленности (Gerasimchuk et al., 2020). Представители *Microvirgula* хорошо растут в аэробных и анаэробных условиях и имеют нетипичный дыхательный тип метаболизма, используют кислород и оксиды азота в качестве конечных акцепторов электрона (Patureau et al., 1998). Род *Microvirgula* впервые описан в работе (Patureau et al., 1998) и охарактеризован как новая денитрифицирующая бактерия *M. aerodenitrificans*, выделенная из активного ила. В настоящее время в род *Microvirgula* входят два вида. Второй представитель, *M. curvata*, был выделен из загрязненных углеводородами почв (Subhash et al., 2016) и включает один штамм. Сравнение секвенированных фрагментов генов 16S рРНК штаммов LM1, LM2, LM6, LM8, LK0l2 и LK0l3 показало, что их последовательности идентичны и имеют 100 % гомологию со штаммом *M. aerodenitrificans* (MT367755) из кишечника диких животных и сходство 99.79 и 99.86 % с типовыми штаммами *M. aerodenitrificans* Sgly2 из активного ила (Patureau et al., 1998) и *M. aerodenitrificans* NBRC 15328 (AB680837) из пресной воды (Cleenwerck et al., 2003) соответственно.

Для многих представителей *Pseudomonas* хорошо изучена липолитическая активность на разных субстратах, а также исследованы и клонированы гены липолитических ферментов (Reetz, Jaeger, 1998; Bofill et al., 2010; Yang W. et al., 2015; Cai et al., 2016) и установлена нефтеокисляющая активность (Muriel-Millán et al., 2019). В то же время для видов *Microvirgula* показана липолитическая активность только на диагностических средах, подробное изучение липолитических свойств не проводилось. Однако анализ

доступных в базе данных NCBI геномов *Microvirgula* позволил обнаружить гены липолитических ферментов. К настоящему моменту опубликованы геномы двух штаммов *M. aerodenitrificans* (JHVK01000000 и CP028519), выделенных из разных биореакторов, и одного штамма *Microvirgula* (NZ_QLTJ01000000) с неустановленным филогенетическим положением, который является бактериальным эндофитом риса. Поиск в перечисленных геномах генов липолитических ферментов выявил присутствие липаз и эстераз. Кроме того, информация о последовательностях *Microvirgula* в базе данных GenBank (номера доступа KM357844, LT631813), выделенных из нефтезагрязненных местообитаний, косвенно свидетельствует о способности к окислению нефти.

Определение липолитической активности штаммов с помощью диагностической среды

Для изучения липолитической активности были отобраны непатогенные штаммы разной филогенетической принадлежности, имеющие отличия в росте или морфологии, для которых получены близкие к полным последовательности 16S рРНК (см. таблицу). Все штаммы росли и образовывали зоны гидролиза на трибутириновом агаре через 24–48 ч культивирования при +28 °С, кроме штамма *P. veronii* sp. Mol4A, который рос без образования зон гидролиза, что связано, скорее всего, с отсутствием липолитической активности и использованием в качестве ростового субстрата пептона, входящего в состав питательной среды. Штаммы *P. protegens* sp. KGS3Ps2, *P. brassicacearum* sp. KGS5k1 и *M. aerodenitrificans* sp. LM1 показали более выраженную липолитическую активность в виде полного гидролиза по сравнению с остальными штаммами, у которых зоны гидролиза составляли около 3 мм. Также штаммы *P. protegens* sp. KGS3Ps2 и *P. brassicacearum* sp. KGS5k1 демонстрировали рост и липолитическую активность при +4 °С.

Способность штаммов утилизировать органические субстраты

При росте на ГРМ-агаре штаммы, относящиеся к *Pseudomonas*, в отличие от штаммов *Microvirgula*, проявляли психротолерантные свойства и демонстрировали рост при +4 °С. Среди отобранных для исследования штаммов не обнаружено термотолерантных представителей, которые показали бы стабильный рост при температуре +50 °С. На ГРМ и трибутириновом агаре не было найдено значимых отличий в росте биомассы при +25 и +28 °С.

На плотных средах с 1 % свиным жиром и 1 % оливковым маслом выявлен рост штаммов *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5k3 при температурах +25 и +28 °С. В посевах на средах со свиным жиром и оливковым маслом при +4 °С деструкции животного и растительного жира не происходило или она была затруднена при пониженных температурах. У *P. protegens* sp. KGS3Ps2 и *P. brassicacearum* sp. KGS5k1 рост на данных средах отсутствовал даже при +28 °С, несмотря на их более выраженную липолитическую активность на диагностической среде.

Скрининг штаммов, проведенный на селективной среде с добавлением дизельного топлива в концентрации 1 %,

показал способность к росту в присутствии углеводородсодержащего субстрата пяти штаммов из десяти, а именно: штаммов *P. protegens* sp. KGS3Ps2, *M. aerodenitrificans* sp. LM1, *P. fildesensis/extremaustralis* sp. Mol4K12, *P. lini* spp. KGS5k3 и KGS5k8. Для подтверждения способности к окислению нефтепродуктов для штаммов *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5k3 как наиболее перспективных штаммов-деструкторов проведены дополнительные посева на плотной минеральной среде с добавлением дизельного топлива в качестве единственного источника углерода. Рост штаммов наблюдался менее чем через 2 суток. Следует отметить, что штамм *P. lini* sp. KGS5k3 образовывал большее количество биомассы.

Заключение

Обнаруженное в ходе исследований филогенетическое и метаболическое разнообразие культивируемых непатогенных бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью указывает на биотехнологический потенциал полученных нами изолятов. Наиболее перспективными являются штаммы *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5k3, которые не только проявили липолитическую активность на диагностической среде в широком диапазоне температур, но и утилизируют такие сложные органические субстраты, как дизельное топливо, свиной жир и оливковое масло. Для представителей *M. aerodenitrificans* впервые показана способность к окислению нефтепродуктов и росту на конкретных жиродержащих субстратах. Ранее сообщалось лишь о наличии у них липолитической активности на диагностических средах (Patureau et al., 1998). Описанный в литературе биотехнологический потенциал представителей *M. aerodenitrificans* заключается в использовании их способности к аэробной и анаэробной денитрификации в технологиях очистки отходов с помощью биореакторов (Patureau et al., 2001; Bouchez et al., 2009; Anderson et al., 2020). Однако выделение флотипов 16S рНК и чистых культур, родственных *Microvirgula*, из нефтезагрязненных природных образцов (Subhash et al., 2016; Sarkar et al., 2017) и сточных вод (Cea et al., 2015; Gerasimchuk et al., 2020), а также полученные нами результаты по росту на средах с добавлением жиров и нефтепродуктов свидетельствуют о более широком биотехнологическом потенциале данной группы микроорганизмов.

Литературные сведения об изучении липолитической активности у *P. lini* не обнаружены. Таким образом, нами впервые показана для представителей данного вида липолитическая активность на диагностической среде, а также способность утилизировать нефтепродукты и животный жир.

Список литературы / References

Герасимчук А.Л., Шаталов А.А., Новиков А.Д., Буторова О.П., Пименов Н.В., Леин А.Ю., Яненко А.С., Карначук О.В. Поиск сульфатредуцирующих бактерий в пробах мата из гидротермального поля Лост Сити методом молекулярного клонирования. *Микробиология*. 2010;79(1):103-113.
[Gerasimchuk A.L., Shatalov A.A., Novikov A.L., Butorova O.P., Pimenov N.V., Lein A.Y., Yanenko A.S., Karnachuk O.V. The search

for sulfate-reducing bacteria in mat samples from the lost city hydrothermal field by molecular cloning. *Microbiology*. 2010;79(1):96-105. DOI 10.1134/S0026261710010133.]

Копылов А.И., Косолапов Д.Б. Структура планктонного микробного сообщества нижней Оби (район г. Салехарда). *Сиб. экол. журн.* 2011;18(1):3-11.

[Kopylov A.I., Kosolapov D.B. The structure of the planktic microbial community in the lower reaches of the Ob river near Salekhard. *Contemp. Probl. Ecol.* 2011;4(1):1-7. DOI 10.1134/S1995425511010012.]

Франк Ю.А., Никитчук К.Л., Сапега А.А., Лукьянова Е.А., Ивасенко Д.А., Косов А.В., Герасимчук А.Л., Евсеева Н.С. Повышение эффективности ремедиации нефтезагрязненных почв в природно-климатических условиях севера Томской области и сопредельных регионов с применением аборигенных микроорганизмов. *Изв. Том. политехн. ун-та. Инжиниринг георесурсов*. 2020;331(9):130-139. DOI 10.18799/24131830/2020/9/2815.

[Frank Y.A., Nikitchuk K.L., Sapega A.A., Lukjanova E.A., Ivasko D.A., Kosov A.V., Gerasimchuk A.L., Evseeva N.S. Improvement of the efficiency of oil-contaminated soils remediation in the natural conditions of the north Tomsk region and the nearby regions by indigenous microorganisms application. *Izvestiya Tomskogo Polytechnicheskogo Universita. Inzhiniring Georesursov = Bulletin of the Tomsk Polytechnic University. Geo Assets Engineering*. 2020; 331(9):130-139. DOI 10.18799/24131830/2020/9/2815. (in Russian)]

Шорникова Е.А. Микробиологическая индикация состояния экосистем водотоков на нефтяных месторождениях Среднего Приобья. *Сиб. экол. журн.* 2008;15(3):417-425.

[Shornikova E.A. Microbiological indication of river ecosystem conditions at the oil fields in the Middle Ob' area. *Contemp. Probl. Ecol.* 2008;1(3):328-334. DOI 10.1134/S1995425508030077.]

Anderson E.L., Jang J., Venterea R.T., Feyereisen G.W., Ishii S. Isolation and characterization of denitrifiers from woodchip bioreactors for bioaugmentation application. *J. Appl. Microbiol.* 2020;129(3): 590-600. DOI 10.1111/jam.14655.

Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N., Nasu M. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003;43(1):111-119. DOI 10.1111/j.15746941.2003.tb01050.x.

Barathi S., Vasudevan N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from petroleum contaminated soil. *Environ. Int.* 2001;26:413-416. DOI 10.1016/S0160-4120(01)00021-6.

Bender J., Fliieger A. Lipases as pathogenicity factors of bacterial pathogens of humans. In: Timmis K.N. (Ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010:3241-3258. DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_246.

Bofill C., Prim N., Mormeneo M., Manresa A., Pastor F.I.J., Diaz P. Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. *Biochimie*. 2010;92(3):307-316. DOI 10.1016/j.biochi.2009.11.005.

Bouchez T., Patureau D., Delgenès J.P., Moletta R. Successful bacterial incorporation into activated sludge flocs using alginate. *Bioresour. Technol.* 2009;100(2):1031-1032. DOI 10.1016/j.biortech.2008.07.028.

Brown B.L., Swan C.M., Auerbach D., Campbell Grant E.H., Hitt N.P., Maloney K.O., Patrick C. Metacommunity theory as a multispecies, multiscale framework for studying the influence of river network structure on riverine communities and ecosystems. *J. North Am. Benthol. Soc.* 2011;30(1):310-327. DOI 10.1899/10-129.1.

Cai X., Chen S., Yang H., Wang W., Lin L., Shen Y., Wei D. Biodegradation of waste greases and biochemical properties of a novel lipase from *Pseudomonas synxantha* PS1. *Can. J. Microbiol.* 2016; 62(7):588-599. DOI 10.1139/cjm-2015-0641.

Cea M., Sangaletti-Gerhard N., Acuña P., Fuentes I., Jorquera M., Godoy K., Osses F., Navia R. Screening transesterifiable lipid ac-

- cumulating bacteria from sewage sludge for biodiesel production. *Biotechnol. Rep.* 2015;8:116-123. DOI 10.1016/j.btre.2015.10.008.
- Chen J., Wang P.F., Wang C., Wang X., Miao L.Z., Liu S., Yuan Q.S. Bacterial communities in riparian sediments: a large-scale longitudinal distribution pattern and response to dam construction. *Front. Microbiol.* 2018;9:999. DOI 10.3389/fmicb.2018.00999.
- Cleenwerck I., De Wachter M., Hoste B., Janssens D., Swings J. *Aquaspirillum dispar* Hylemon et al. 1973 and *Microvirgula aerodenitrificans* Patureau et al. 1998 are subjective synonyms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003;53(5):1457-1459. DOI 10.1099/ijs.0.02675-0.
- Cyriaque V., Géron A., Billon G., Nesme J., Werner J., Gillan D.C., Wattiez R. Metal-induced bacterial interactions promote diversity in river-sediment microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020;96(6): 5826176. DOI 10.1093/femsec/fiaa076.
- Dai Y., Yang Y.Y., Wu Z., Feng Q.Y., Xie S.G., Liu Y. Spatiotemporal variation of planktonic and sediment bacterial assemblages in two plateau freshwater lakes at different trophic status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100(9):4161-4175. DOI 10.1007/s00253-015-7253-2.
- DeLong E.F. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:5685-5689. DOI 10.1073/pnas.89.12.5685.
- Delorme S., Lemanceau P., Christen R., Corberand T., Meyer J.M., Gardan L. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52(2):513-523. DOI 10.1099/00207713-52-2-513.
- de Oliveira L.F.V., Margis R. The source of the river as a nursery for microbial diversity. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120608. DOI 10.1371/journal.pone.0120608.
- De Vrieze M., Pandey P., Bucheli T.D., Varadarajan A.R., Ahrens C.H., Weisskopf L., Bailly A. Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. *Front. Microbiol.* 2015;6:1295. DOI 10.3389/fmicb.2015.01295.
- Elomari M., Coroler L., Hoste B., Gillis M., Izard D., Leclerc H. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996;46(4):1138-1144. DOI 10.1099/00207713-46-4-1138.
- Fendri I., Chaari A., Dhouib A., Jlassi B., Abousalham A., Carrière F., Sayadi S., Abdelkafi S. Isolation, identification and characterization of a new lipolytic *Pseudomonas* sp., from Tunisian soil. *Environ. Technol.* 2010;31(1):87-95. DOI 10.1080/09593330903369994.
- Fischer H., Wanner S.C., Pusch M. Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry.* 2002;61:37-55. DOI 10.1023/A:1020298907014.
- Frank Y.A., Vorobiev E.D., Vorobiev D.S., Trifonov A.A., Antsiferov D.V., Soliman Hunter T., Wilson S.P., Strezov V. Preliminary screening for microplastic concentrations in the surface water of the Ob and Tom rivers in Siberia, Russia. *Sustainability.* 2021;13(1):80. DOI 10.3390/su13010080.
- Gerasimchuk A.L., Ivasenko D.A., Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Frank Y.A. Search for new cultured lipophilic bacteria in industrial fat-containing wastes. *BIO Web Conf. II Int. Sci. Conf. "Plants and Microbes: The Future of Biotechnology"* (PLAMIC2020). 2020;23: 02012. DOI 10.1051/bioconf/20202302012.
- Iyer R., Iken B., Damania A. Genome of *Pseudomonas nitroreducens* DF05 from dioxin contaminated sediment downstream of the San Jacinto River waste pits reveals a broad array of aromatic degradation gene determinants. *Genom. Data.* 2017;17(14):40-43. DOI 10.1016/j.gdata.2017.07.011.
- Koronkevich N.I., Barabanova E.A., Georgiadi A.G., Zaitseva I.S., Shaporenko S.I. Anthropogenic impacts on the water resources of the Russian Arctic basin rivers. *Geogr. Nat. Resour.* 2019;40(1):22-29. DOI 10.1134/S1875372819010049.
- Kovacic F., Babić N., Krauss U., Jaeger K.-E. Classification of lipolytic enzymes from bacteria. In: Rojo F. (Ed.) *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid microbiology.* Cham: Springer, 2019;255-289. DOI 10.1007/978-3-319-50418-6_39.
- Lee S.Y., Rhee J.S. Hydrolysis of triglyceride by the whole cell of *Pseudomonas putida* 3SK in two-phase batch and continuous reactors systems. *Biotechnol. Bioeng.* 2008;44:437-443. DOI 10.1002/bit.260440406.
- Li J., Wang L.-H., Xiang F.-G., Ding W.-L., Xi L.-J., Wang M.-Q., Xiao Z.-J., Liu J.-G. *Pseudomonas phragmitis* sp. nov., isolated from petroleum polluted river sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70(1):364-372. DOI 10.1099/ijs.0.003763.
- López J.R., Diéguez A.L., Doce A., De la Roca E., De la Herran R., Navas J.I., Toranzo A.E., Romalde J.L. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012;62(4):874-882. DOI 10.1099/ijs.0.030601-0.
- Mansour I., Heppell C.M., Ryo M., Rillig M.C. Application of the microbial community coalescence concept to riverine networks. *Biol. Rev.* 2018;93(4):1832-1845. DOI 10.1111/brv.12422.
- Mourey A., Kilbertus G. Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J. Appl. Bacteriol.* 1976;40:47-51. DOI 10.1111/j.1365-2672.1976.tb00589.x.
- Mulet M., Gomila M., Lemaitre B., Lalucat J., García-Valdés E. Taxonomic characterization of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 2012;35:145-149. DOI 10.1016/j.syapm.2011.12.003.
- Muriel-Millán L.F., Rodríguez-Mejía J.L., Godoy-Lozano E.E., Rivera-Gómez N., Gutierrez-Rios R.-M., Morales-Guzmán D., Trejo-Hernández M.R., Estradas-Romero A., Pardo-López L. Functional and genomic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from the southwestern gulf of Mexico reveals an enhanced adaptation for long-chain alkane degradation. *Front. Mar. Sci.* 2019;6:572. DOI 10.3389/fmars.2019.00572.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden U.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993;59(3):695-700. DOI 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
- Pabai F., Kermasha S., Morin A. Use of continuous culture to screen for lipase-producing microorganisms and interesterification of butterfat by lipase isolates. *Can. J. Microbiol.* 1996;42:446-452. DOI 10.1139/m96-061.
- Parte A. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D613-D616. DOI 10.1093/nar/gkt1111.
- Patureau D., Godon J.J., Dabert P., Bouchez T., Bernet N., Delgenes J.P., Moletta R. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998;48:775-782. DOI 10.1099/00207713-48-3-775.
- Patureau D., Helloin E., Rustrian E., Bouchez T., Delgenes J., Moletta R. Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. *Water Res.* 2001;35(1):189-197. DOI 10.1016/s0043-1354(00)00244.
- Peix A., Ramírez-Bahena M.-H., Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* 2009;9(6):1132-1147. DOI 10.1016/j.meegid.2009.08.001.
- Pellett S., Bigley V.D., Grimes D.J. Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45(1):328-332. DOI 10.1128/aem.45.1.328-332.1983.
- Pirnay J.-P., Matthijs S., Colak H., Chablain P., Bilocq F., Van Eldere J., De Vos D., Zizi M., Triest L., Cornelis P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ. Microbiol.* 2005;7(7):969-980. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00776.x.
- Psenner R., Alfreider A., Schwarz A. Aquatic microbial ecology: water desert, microcosm, ecosystem. What's text? *Int. Rev. Hydrobiol.* 2008;93(4-5):606-623. DOI 10.1002/IROH.200711044.

- Ramette A., Frapolli M., Saux M.F.-L., Gruffaz C., Meyer J.-M., Défago G., Sutra L., Moënne-Loccoz Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011;34(3):180-188. DOI 10.1016/j.syapm.2010.10.005.
- Ramnath L., Sithole B., Govinden R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. *Biotechnol. Rep.* 2017;15:114-124. DOI 10.1016/j.btre.2017.07.004.
- Reetz M.T., Jaeger K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem. Phys. Lipids.* 1998;93(1-2):3-14. DOI 10.1016/S0009-3084(98)00033-4.
- Sagova-Mareckova M., Boenigk J., Bouchez A., Cermakova K., Chonova T., Cordier T., Eisendle U., Elerseck T., Fazi S., Fleituch T., Frühe L., Gajdosova M., Graupner N., Haegerbaeumer A., Kelly A.-M., Kopecky J., Leese F., Nöges P., Orlic S., Panksep K., Pawlowski J., Petrusek A., Piggott J.J., Rusch J.C., Salis R., Schenk J., Simek K., Stovicek A., Strand D.A., Vasquez M.I., Vrålstad T., Zlatkovic S., Zupancic M., Stoek T. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water Res.* 2021;191:116767. DOI 10.1016/j.watres.2020.116767.
- Sarkar P., Roy A., Pal S., Mohapatra B., Kazy S.K., Maiti M.K., Sar P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for *in situ* bioremediation. *Bioresour. Technol.* 2017;242:15-27. DOI 10.1016/j.biortech.2017.05.010.
- Savichev O.G., Tokarenko O.G., Pasechnik E.Yu., Nalivaiko N.G., Ivanova E.A., Nadeina L.V. Microbiological composition of river waters in the Ob' basin (West Siberia) and its associations with hydrochemical indices. *IOP Conf. Series: Earth Environ. Sci.* 2015;27:012035. DOI 10.1088/1755-1315/27/1/012035.
- Shomikova E., Arslanova M. The experience of application of microbiological indicators in monitoring procedures of aquatic ecosystems in the Middle Ob basin. *E3S Web Conf.* 2020;210:07013. DOI 10.1051/e3sconf/202021007013.
- Subhash Y., Park M.J., Lee S.S. *Microvirgula curvata* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil, and emended description of the genus *Microvirgula*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016;66:5309-5313. DOI 10.1099/ijsem.0.001512.
- Sudan S.K., Pal D., Bisht B., Kumar N., Chaudhry V., Patil P., Sahni G., Mayilraj S., Krishnamurthi S. *Pseudomonas fluvialis* sp. nov., a novel member of the genus *Pseudomonas* isolated from the river Ganges, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018;68(1):402-408. DOI 10.1099/ijsem.0.002520.
- Wang J., Li Y., Wang P., Niu L., Zhang W., Wang C. Response of bacterial community compositions to different sources of pollutants in sediments of a tributary of Taihu Lake, China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016;23(14):13886-13894. DOI 10.1007/s11356-016-6573-9.
- Wang L., Zhang J., Li H., Yang H., Peng C., Peng Z., Lu L. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci. Total. Environ.* 2018;627:600-612. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.01.203.
- Wei C.L., Bao S., Zhu X.Y., Huang X.X. Spatio-temporal variations of the bacterioplankton community composition in Chaohu Lake, China. *Prog. Nat. Sci.* 2008;18(9):1115-1122. DOI 10.1016/j.pnsc.2008.04.005.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991;173:697-703. DOI 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Yang J., Zhang B., Yan Y. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009;159:355-365. DOI 10.1007/s12010-008-8419-5.
- Yang W., Cao H., Xu L., Zhang H., Yan Y. A novel eurythermic and thermostable lipase LipM from *Pseudomonas moraviensis* M9 and its application in the partial hydrolysis of algal oil. *BMC Biotechnol.* 2015;15:94. DOI 10.1186/s12896-015-0214-0.
- Zhang L., Zhao T., Wang Q., Li L., Shen T., Gao G. Bacterial community composition in aquatic and sediment samples with spatiotemporal dynamics in large, shallow, eutrophic Lake Chaohu, China. *J. Freshw. Ecol.* 2019;34(1):575-589. DOI 10.1080/02705060.2019.1635536.

ORCID ID

A.L. Gerasimchuk orcid.org/0000-0002-2945-2364

D.A. Ivasenko orcid.org/0000-0001-7132-182X

Yu.A. Frank orcid.org/0000-0001-6347-4009

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.03.2022. После доработки 20.05.2022. Принята к публикации 24.05.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков

И.В. Цыганов^{1, 2}✉, А.Г. Ткаченко^{1, 2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия
✉ zamegagurrendan@gmail.com

Аннотация. Из всех известных способов передвижения бактерий скольжение является наименее изученным. Впервые описанное для микобактерий и некоторых других бактериальных видов, скольжение представляет собой пассивный способ перемещения по поверхности полужидких питательных сред у видов, лишенных оргanelл движения. Несмотря на отсутствие механизмов перемещения, некоторые микобактерии способны быстро колонизировать поверхности, в том числе ткани многоклеточных организмов, за счет присутствия в составе наружного слоя их клеточной стенки гликопептидолипидов, регулирующих силу трения о поверхность при перемещении. Это представляет серьезную проблему для эффективной терапии микобактериозов, вызываемых нетуберкулезными микобактериями. Кроме того, ткани многоклеточных животных содержат биогенные полиамины, которые способны повышать устойчивость микроорганизмов к различным стрессам, в том числе к антибиотикам, и модулировать коллективное движение. Поэтому исследование совместного действия биогенных полиаминов и антибиотиков на процессы распространения микобактерий представляет большой интерес для медицины. В качестве объектов исследования использованы штаммы микобактерий, включая родительский штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² 155, а также его производные, содержащие одинарную (Δrel_{Msm}) или двойную ($\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$) хромосомные делеции. Содержание гликопептидолипидов определяли с помощью метода тонкослойной хроматографии. Интенсивность скольжения оценивали путем измерения площади скользящей колонии. Эффективность действия антибиотиков характеризовали сравнением площадей скользящих колоний в присутствии сопоставимых концентраций антибиотиков, выраженных в значениях, кратных минимальной подавляющей концентрации. Показано, что полиамины спермидин и спермин оказывают разнонаправленные эффекты на скольжение микобактерий по поверхностям полужидких сред, соответственно повышая или снижая площади колоний. При этом использовали концентрации спермидина и спермина, которые сами по себе не оказывали бактерицидный или бактериостатический эффект. Однако их совместное применение с антибиотиками стрептомицином или изониазидом приводило к снижению антибактериального эффекта, но усиливало действие синтетического аналога природного антибиотика эрогоргиаена (DMNP). Наиболее эффективным в этих условиях был рифампицин. Более того, нами установлено, что гликопептидолипиды, по-видимому, являются не единственными регуляторами скольжения микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии; скольжение; антибиотикочувствительность; полиамины.

Для цитирования: Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на скольжение микобактерий в присутствии антибиотиков. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):458-466. DOI 10.18699/VJGB-22-56

Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics

I.V. Tsyganov^{1, 2}✉, A.G. Tkachenko^{1, 2}

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

² Perm State University, Perm, Russia
✉ zamegagurrendan@gmail.com

Abstract. Nowadays, sliding is the least investigated mode of bacterial motility. Sliding is a process of passive movement on the surface of semi-liquid mediums which was originally described for mycobacteria and other bacterial species deprived of the organelles specialized for movement. Some mycobacteria are able to colonize surfaces, including tissues of macro-organisms, using glycopeptidolipids localized in the cell envelope for this aim. This is a serious problem for effective therapy of mycobacteriosis caused by nontuberculosis mycobacteria. Furthermore, animal tissues contain biogenic polyamines, which can increase tolerance of microorganisms to stresses, including antibiotics, and modulate cell motility. Therefore, studying mutual effects of biogenic polyamines and antibiotics on the expansion of mycobacteria is important for medicine. Mycobacterial strains, including the parent *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 and strains containing single (Δrel_{Msm}) or double ($\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$) deletions, were used as the objects of this study. The content of glycopeptidolipids was determined using thin layer chromatography. Sliding motility was assessed by measuring the

area of the sliding colony. The effectiveness of antibiotics was measured by comparison of the areas of sliding colonies in the presence of comparable concentrations of antibiotics. The polyamines spermidine and spermine had different effects on the sliding of mycobacteria through an increase or decrease in the colony areas. At the same time, polyamines had neither bactericidal nor bacteriostatic effects. The polyamines contained in the medium decreased the bactericidal effects of the antibiotics streptomycin or isoniazid, but enhanced the effects of DMNP, a synthetic analogue of the natural antibiotic erogorgiaene. Rifampicin was the most effective of all antibiotics investigated here. Moreover, we found that glycopeptidolipids are, apparently, not the only regulators of mycobacterial sliding.

Key words: mycobacteria; sliding motility; antibiotic susceptibility; biogenic polyamines.

For citation: Tsyganov I.V., Tkachenko A.G. Effect of biogenic polyamines on sliding motility of mycobacteria in the presence of antibiotics. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):458-466. DOI 10.18699/VJGB-22-56

Введение

Скольжение – пассивный способ распространения бактерий по поверхностям полужидких сред, который был впервые описан в 1972 г. (Henrichsen, 1972). В основе механизма скольжения лежит действие экспансивной силы, возникающей при давлении друг на друга деформирующихся клеток. Бактерии толкают друг друга, распространяясь по поверхности в виде монослоя, а выделение клетками во внешнюю среду поверхностно-активных веществ (Нölscher, Kovács, 2017) или наличие гликопептидолипидов (ГПЛ) в составе клеточной стенки (Recht et al., 2000) препятствует скапливанию бактерий и образованию трехмерных структур. Поскольку скольжение возможно без участия таких органелл движения, как жгутики или пили, данный тип движения доступен видам, которые ранее считались неподвижными. Например, в 1999 г. было обнаружено, что считавшиеся неподвижными микобактерии способны скользить по полужидким средам (Martínez et al., 1999). Позднее была установлена связь между содержанием ГПЛ в клеточных стенках микобактерий и способностью к скольжению. Согласно этой модели, ГПЛ, расположенные на внешнем слое клеточной стенки, обращены гидрофобными «хвостами» во внешнюю среду, создавая гидрофобную поверхность клетки. Гидрофобные остатки жирных кислот в ГПЛ не взаимодействуют с гидрофильной поверхностью агаризованной среды, облегчая бактериям скольжение. Напротив, взаимодействие с гидрофобной поверхностью способствует прикреплению к субстрату, что подтверждается образованием биопленок на поливинилхлоридных иммунологических планшетах (Recht et al., 2000).

Таким образом, в настоящее время ГПЛ считаются ключевым фактором скольжения у микобактерий. Тем не менее на скольжение может влиять множество факторов внешней среды, например внеклеточные сигнальные молекулы. Для других типов коллективного движения, таких как подтягивание (twitching) или роение (swarming), уже открыты сигнальные молекулы, модулирующие движение, но не оказывающие бактерицидное действие. Так, внеклеточный АТФ, выделяемый поврежденными эпителиальными клетками, является сигнальной молекулой, ингибирующей подтягивающее движение *Pseudomonas aeruginosa* (Nolan et al., 2015), а полиамины (ПА) путресцин и спермидин, синтезируемые *Escherichia coli*, необходимы для инициации роения (Kurihara et al., 2009).

Роль полиаминов как сигнальных молекул имеет особое значение, поскольку данные поликатионы присутствуют

в клетках и тканях большинства живых организмов, а также в воде и почве. В крови, коже и слизистых оболочках человека тоже содержатся ПА, преимущественно кадаверин, спермидин и спермин, концентрация которых в отдельных случаях может достигать 2–10 мМ (Gugliucci, 2004). Бактерии, в свою очередь, синтезируют путресцин, кадаверин и спермидин. Гены синтеза ПА обнаружены в геноме микобактерий (Замахаев и др., 2018), но ранее нами было показано, что, в отличие от *E. coli*, микобактерии не синтезируют полиамины самостоятельно (Zamakhayev, 2020), однако способны транспортировать данные поликатионы из внешней среды. Полиамины обладают положительным зарядом, благодаря чему могут связываться с отрицательно заряженными молекулами в клетках, в первую очередь с нуклеиновыми кислотами, и влиять на репликацию, транскрипцию, трансляцию и другие внутриклеточные процессы. Бактерии, попадая на ткани, близкие по влажности к полужидкому агару, например слизистые оболочки, способны скользить по среде, богатой биогенными полиаминами, которые, в свою очередь, могут модулировать внутриклеточные процессы.

Исследование скольжения микобактерий представляет большой интерес, поскольку нетуберкулезные микобактерии, в составе клеточных стенок которых присутствуют ГПЛ, являются причиной инфекций легких и кожи (Tran et al., 2019). Осложняет проблему то, что нетуберкулезным инфекциям легких (НТИЛ) уделяется меньше внимания, вследствие чего показатели заболеваемости, вероятно, занижены, что не помешало НТИЛ превзойти заболеваемость туберкулезом в США (Strollo et al., 2015). Из-за отсутствия в клеточной стенке ГПЛ *Mycobacterium tuberculosis* в настоящее время считается не способным к скольжению. Тем не менее в клеточных стенках этого вида присутствуют фосфатидилинозитолманнозиды, фенольные гликолипиды, а также липоманнан и липоарабиноманнан (Tran et al., 2019). Перечисленные липиды тоже обладают способностью создавать гидрофобную среду, аналогичную той, что объясняет модель скольжения *M. smegmatis*.

Ранее нами показано, что синтетический аналог природного дитерпена эрогоргияена – DMNP, наряду с широко используемыми клиническими антибиотиками, обладает антимикобактериальной активностью. Его мишенями являются большая и малая алармон синтазы Rel_{Msm} и RelZ, регулирующие внутриклеточный уровень алармона гуанозинтетрафосфата (p)ppGpp (Tkachenko et al., 2021),

что делает новое соединение эффективным против покоящихся клеток и перспективным веществом для разработки новых антимикобактериальных препаратов. Исходя из этого, предметом изучения стало возможное воздействие DMNP в отношении скользящих колоний *M. smegmatis*. Проведено сравнение нового соединения с широко применяемыми на практике антибиотиками рифампицином, стрептомицином и изониазидом, исследовано его влияние на антибиотикочувствительность микобактерий биогенных полиаминов как веществ, представленных в естественной среде и обладающих доказанным протекторным действием в отношении бактерий (Sarkar et al., 1995).

Материалы и методы

Объект исследования и условия культивирования.

Объектом исследования служили штаммы *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. В качестве контрольного использован родительский штамм без делеций генов, который обозначен на графиках как WT. Опытные штаммы с одинарной делецией гена Δrel_{Msm} и с двойной делецией генов $\Delta rel_{Msm}\Delta relZ$ сконструированы на его основе сотрудником лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН Сидоровым Романом Юрьевичем (Tkachenko et al., 2021). Культуры хранились в чашках Петри с агаризованной средой Luria–Bertani (LB) (Sigma, США).

Для эксперимента культуру высевали на пробирку с 5 мл жидкой среды Middlebrook 7H9 (HIMEDIA, Индия), содержащей глицерин. Кроме того, среда содержала 25 мкг/мл ампициллина (ITW Reagents, США) и 0.05 % твин 80 («Росмедбио», Россия). Пробирку культивировали в течение 24 ч в термостатируемом шейкере (37 °C, 200 об/мин), после чего пересевали на колбу с 30 мл свежей среды и культивировали в аналогичных условиях до оптической плотности 2.0–2.4.

Скольжение. Скользящие колонии выращивали в пластиковых чашках Петри (40 мм). Жидкую среду Middlebrook 7H9 без глицерина агаризовали добавлением 0.3 % агарозы («Хеликон», Россия). Полиамины и антибиотики вносили в чашку предварительно, с последующим добавлением 3 мл остывшей до 47 °C жидкой агаризованной среды. Чашки сушили при комнатной температуре 24 ч. Культуру клеток разводили до оптической плотности 0.2 (ОП₆₀₀), вносили в объеме 0.5 мкл в центр чашки Петри, после чего культивировали в термостате при 37 °C в течение 24 ч.

Определение площади колонии. Чашки с выросшими колониями фотографировали на камеру Olympus C-3040 ZOOM (Olympus, Япония). Площадь измеряли в бесплатной пробной версии Photoshop CC 2015.5 (Adobe, США), определяя площадь колонии в пикселях, а затем сравнивая с реальной площадью, соответствующей одному пикселю. Реальную площадь одного пикселя устанавливали, сравнивая диаметр чашки в пикселях с известным диаметром реальной чашки.

Определение оптической плотности колонии. Подробно метод описан в работе (Tkachenko et al., 2021). Для определения оптической плотности обесцвечивали ранее полученные фотографии колоний с помощью программы Photoshop CC 2015.5. Колонию выделяли с использованием инструмента «быстрое выделение», яркость оце-

нивали инструментом «гистограмма». Для инверсии освещенности учитывали яркость фона. На основе полученных значений яркостей фона считали среднее арифметическое и вычитали его из яркости колонии.

Минимальную подавляющую концентрацию антибиотика (МПК) определяли методом двукратных серийных разведений в иммунологических планшетах («Минимед», Россия). За МПК принимали минимальную концентрацию, при которой отсутствовал видимый рост клеточной культуры в лунке планшета.

Определение содержания гликопептидолипидов.

Культуры клеток выращивали в течение 48 ч до стационарной фазы, что соответствовало времени выращивания биопленок. Оптическую плотность измеряли и доводили до ОП₆₀₀ = 1.5 в 40 мл. Клетки отмывали от питательной среды, помещали в 600 мкл смеси хлороформ:метанол (2:1) и выдерживали 2 ч в ультразвуковой ванне (ELMA, Германия) при температуре 56 °C. Фрагменты клеток отделяли от супернатанта центрифугированием (15 мин, 12000 об/мин). Супернатант отбирали и добавляли к нему дистиллированную воду (1:1), перемешивали и центрифугировали (1 мин, 12000 об/мин). Органическую фазу извлекали, а затем выпаривали. К высушенному остатку добавляли 100 мкл смеси хлороформ:метанол (9:1) и наносили в объеме 10 мкл на хроматографические пластины с силикагелем 60 (Merck, Германия). Пробы разделяли в системе хлороформ:метанол (9:1), после чего пластины высушивали и опрыскивали 10 % раствором серной кислоты в этаноле. Результат визуализировали обугливанием при температуре 180 °C в течение 90 с.

Биопленки выращивали в течение 48 ч в пластиковых чашках диаметром 40 мм («Медполимер», Россия). В чашки вносили 4.5 мл среды Middlebrook 7H9 без твин 80. Культуры клеток отмывали и вносили в объеме 500 мкл в чашки таким образом, чтобы конечная оптическая плотность клеток в чашке была равна 0.1 (ОП₆₀₀). Результаты фиксировали фотографически.

Микроскопия монослоя скользящих колоний.

Скользкие колонии наблюдали при помощи оборудования для фазового контраста ФАТЕК 6-7 («ЛОМО», Россия) на микроскопе МИКМЕД-6 («ЛОМО»). Результаты фиксировали на камеру для микроскопа МС 6.3 («ЛОМО»).

Статистическая обработка результатов выполнена в пакете стандартных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). На графиках отражены медианы (значения 4–10 экспериментов), вертикальными отрезками обозначены величины первого и третьего квартилей. Оценка статистической значимости различий произведена с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты

Зависимость скольжения от генотипа штаммов микобактерий

В ходе исследования было установлено, что все штаммы имели возможность скользить и формировать монослой клеток (рис. 1). При этом родительский штамм без делеций формировал колонию, площадь которой была заметно меньше, чем площадь колонии штамма с делецией гена

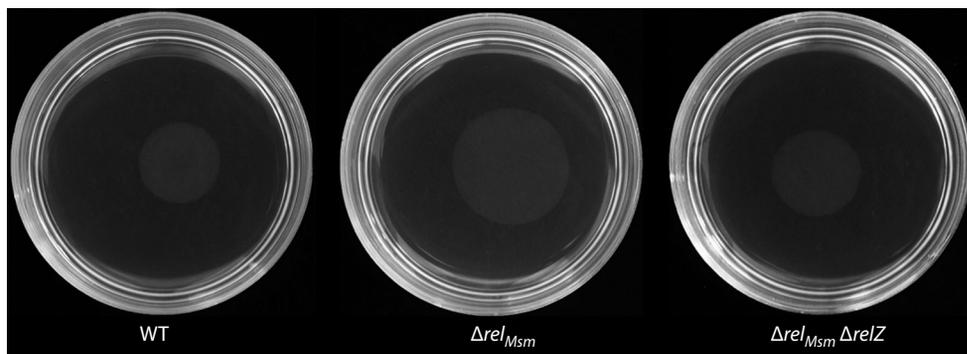


Рис. 1. Скольжение штаммов микобактерий.

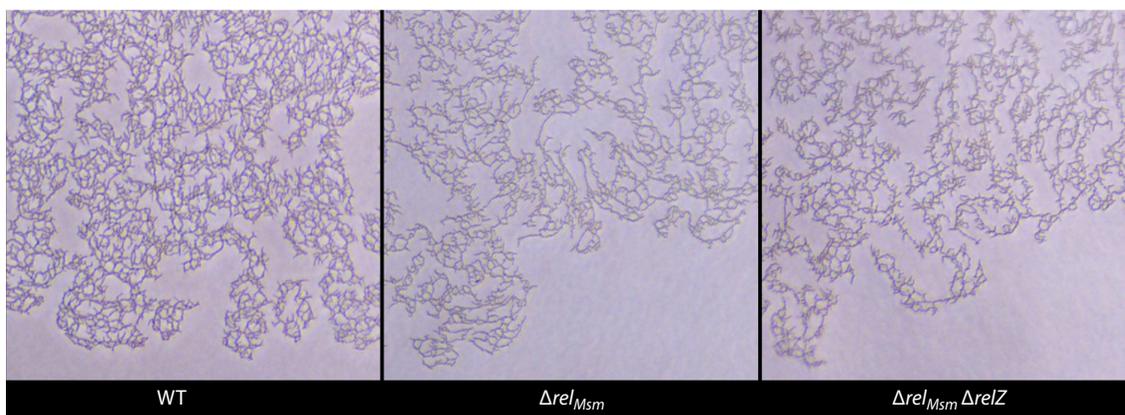


Рис. 2. Край монослоя скользящих колоний.

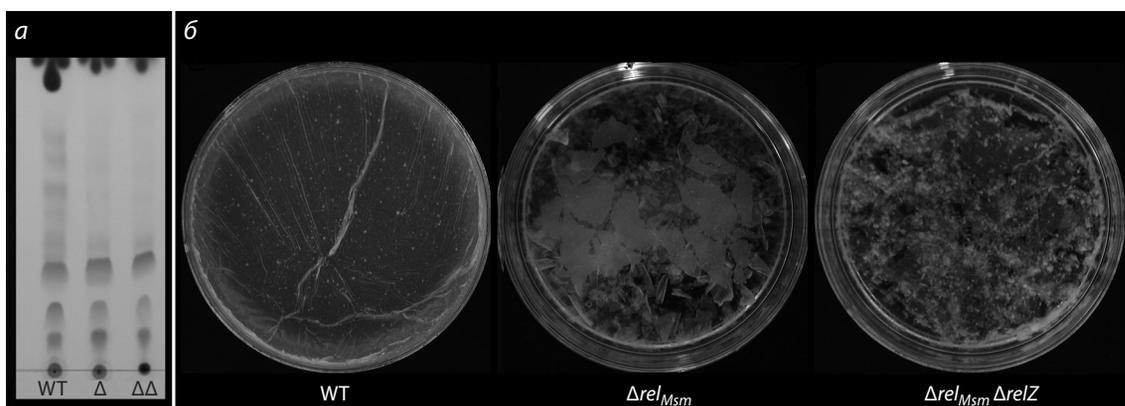


Рис. 3. Зависимость между гидрофобностью поверхностной биопленки и содержанием гликопептидолипидов в клетках. Влияние активности генов *relMsm* и *relZ* на количество ГПЛ в клетках *M. smegmatis* (a) и на биопленкообразование *M. smegmatis* (б). Δ – штамм с делецией гена *relMsm*; ΔΔ – штамм с двойной делецией генов *relMsm* и *relZ*.

Δrel_{Msm} , но незначительно отличалась от штамма с двойной делецией $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$.

Исследование края колоний при помощи микроскопии методом фазового контраста подтвердило первоначальный вывод, сделанный на основе сравнения площадей колоний: клетки штаммов с делециями генов располагались менее плотно по сравнению с родительским штаммом (рис. 2). Данный факт свидетельствует о том, что делеционные штаммы скользили лучше, чем родительский.

При исследовании содержания гликопептидолипидов в клеточных стенках микобактерий оказалось, что родительский штамм содержал наибольшее количество ГПЛ (рис. 3, a). Мутантные штаммы продемонстрировали уменьшение количества ГПЛ прямо пропорционально росту числа делеций. Тем не менее уменьшение количества ГПЛ в клеточных стенках делеционных штаммов не приводило к уменьшению площади скользящих колоний (см. рис. 1). Этот факт может говорить о том, что либо ГПЛ не

участвуют в формировании гидрофобной поверхности, облегчающей скольжение, либо помимо ГПЛ существуют другие регуляторы скольжения, модулирующие свойства клеточной поверхности и влияющие на скольжение.

Данные о содержании ГПЛ были сопоставимы с полученными нами ранее результатами по биоленкообразованию микобактерий (Tkachenko et al., 2021), а также согласуются с информацией о связи между количеством ГПЛ в клеточной стенке и степенью гидрофобности бактериальной поверхности (Recht et al., 2000). Согласно модели скольжения микобактерий, ГПЛ формируют гидрофобную клеточную поверхность микобактерий, которая позволяет успешно скользить по гидрофильным средам. Наши исследования показали (см. рис. 3, б), что клетки родительского штамма, благодаря присутствию в их поверхностных структурах достаточно большого количества ГПЛ, были способны формировать поверхностные биоленки, удерживаемые на водной поверхности, которые не опускались на дно даже после нарушения целостности биоленки.

В отличие от этого, штамм с одной делецией Δrel_{Msm} содержал меньше ГПЛ, и, соответственно, помимо дефектов в биоленкообразовании, связанных с нарушением активности гена алармон синтетазы, фрагменты биоленок обладали меньшей гидрофобностью и частично погружались на дно чашки. Штамм же с двойной делецией $\Delta rel_{Msm} \Delta relZ$ характеризовался наименьшим количеством ГПЛ в клеточной стенке, и вследствие наименьшей гидрофобности поверхности относительно других штаммов фрагменты его поверхностной биоленки полностью опускались на дно чашки (см. рис. 3, б). Поскольку измерение биомассы поверхностных биоленок показало отсутствие статистически значимых различий между штаммами (Tkachenko et al., 2021), такое фазовое распределение фрагментов биоленки зависело в первую очередь от гидрофобности клеток, а не от массы фрагментов.

Влияние полиаминов на скольжение

При последующем исследовании скольжения и статистической обработке данных были получены результаты, подтвердившие статистически значимое превосходство площадей скользящих колоний штамма с одинарной делецией гена rel_{Msm} . Площади колоний, образуемые штаммом с двойной делецией, статистически не превышали площадь колоний родительского штамма (рис. 4). Внесение в среду скольжения биогенных полиаминов спермидина и спермина как наиболее характерных для тканей многоклеточных организмов вызывало разнонаправленный эффект. Спермидин способствовал значительному увеличению площадей колоний у родительского штамма и штамма с одной делецией, тогда как спермин статистически значимо снижал площадь скользящих колоний. Эффект был прямо пропорционален числу делеций в штаммах (см. рис. 4).

Как известно, оба использованных нами вида полиаминов обладают положительным зарядом благодаря наличию amino- и иминогрупп (Gugliucci, 2004). Тем не менее они оказывали разнонаправленное действие на скольжение. В этом случае эффект полиаминов невозможно объяснить одним лишь влиянием на поверхностный заряд клетки. Полученное нами снижение площади колоний в результа-

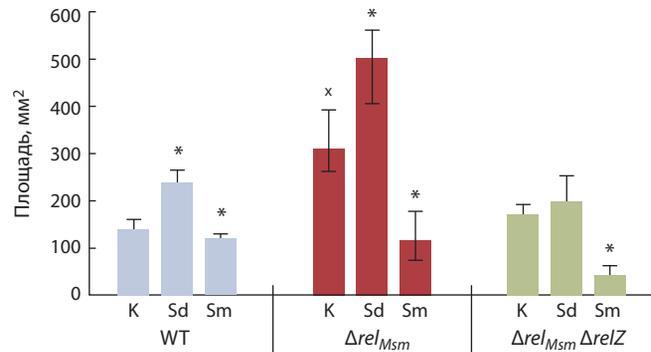


Рис. 4. Влияние полиаминов на скольжение штаммов *M. smegmatis*.

K – контроль без добавки полиаминов; Sd – спермидин, 2 мМ; Sm – спермин, 2 мМ. Статистически значимое отличие (критерий Манна–Уитни, $p \leq 0.05$): * от контрольной колонии того же штамма, выращенной на среде без добавки полиаминов; ^x от контрольной колонии штамма без делеций генов (WT), выращенной на среде без добавки.

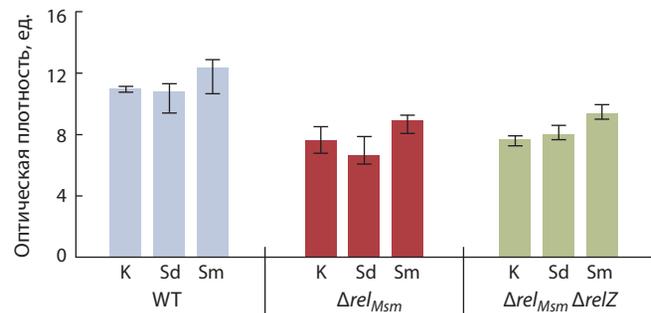


Рис. 5. Влияние полиаминов на оптическую плотность скользящих колоний *M. smegmatis*.

K – контроль без добавки полиаминов; Sd – спермидин, 2 мМ; Sm – спермин, 2 мМ.

те действия спермина можно было бы интерпретировать его вероятным бактериостатическим эффектом. Однако ранее показано, что использованные нами концентрации полиаминов не оказывали эффекта на скорость роста и жизнеспособность микобактерий в жидкой культуре (Цыганов и др., 2017).

Чтобы получить дополнительную информацию о влиянии полиаминов на биомассу скользящих колоний микобактерий, мы попытались оценить оптическую плотность или численность клеток в культуре, полученной количественным смывом колонии заданным объемом среды. Однако вследствие гидрофобности поверхности микобактерий, выросших на среде без твин 80, не представлялось возможным полностью разделить их между собой, а также отделить от остатков агаризованной среды. Поэтому косвенную оценку биомассы колоний проводили изменением величины яркости колоний на фотографиях, т. е. оптической плотности, стандартизированной относительно фоновых значений плотности окружающей колонии среды (рис. 5). По результатам измерения установлено, что изменение площадей скользящих колоний обусловлено исключительно эффектом полиаминов на скольжение и никак не связано с возможностью их бактериостатического или бактерицидного действия (см. рис. 5).

Статистически значимое изменение площадей колоний в присутствии полиаминов (см. рис. 4) не сопровождалось изменением биомассы скользящих колоний, выраженной через оптическую плотность (см. рис. 5). Это подтверждает вывод о том, что полиамины спермидин и спермин не оказывали бактерицидного или бактериостатического эффекта. Различия в оптической плотности между родительским штаммом и штаммами с делециями генов объясняются сопутствующим изменением ростовых характеристик, вызванных изменением генотипа опытных штаммов *M. smegmatis* относительно родительского.

Влияние полиаминов на скольжение в присутствии антибиотиков

Для исследования влияния антибиотиков на скольжение микобактерий были подобраны сублетальные концентрации, которые статистически значимо уменьшали площади скользящих колоний. Для сравнительного анализа антибиотиков все использованные концентрации выражены в значениях кратностей минимальной подавляющей концентрации соответствующего антибиотика, которая была определена предварительно.

При сравнении эффективности антибиотиков установлено, что рифампицин сильнее всех способствовал уменьшению площади скользящих колоний всех трех штаммов микобактерий, тогда как стрептомицин и изониазид обладали приблизительно одинаковой эффективностью (рис. 6–8). DMNP демонстрировал наименьший антибактериальный эффект в отношении растущих скользящих колоний, что обусловлено его действием прежде всего в

отношении клеток стационарной фазы (Tkachenko et al., 2021), тогда как в активно растущей колонии бактерии преимущественно находятся в состоянии роста.

Кроме того, поскольку DMNP растворяется в метаноле, мы исследовали влияние метанола на скольжение микобактерий. Показано, что при добавлении в среду метанола в объеме, использованном при добавлении DMNP (50 мкл), площади колоний превосходили значения, полученные в контроле без добавления метанола (см. рис. 6–8). При совместном действии спермина и минимальных концентраций рифампицина и стрептомицина наблюдалась картина, аналогичная действию данного полиамина в отсутствие антибиотиков: площади колоний были меньше контрольных, выросших на среде с антибиотиком, но без полиамина (см. рис. 6).

Эффект полиаминов значительно изменялся при максимальных концентрациях антибиотиков. В присутствии DMNP колонии, выросшие на среде без полиаминов, превосходили те, что выросли на среде со спермидином и спермином. Совместное действие DMNP и обоих полиаминов повышало эффект уменьшения площади скольжения до уровней, близких к значениям эффективности антибиотиков стрептомицина и изониазида в отсутствие ПА. В то же время площади колоний, выросших на среде с добавлением полиаминов и максимальными концентрациями стрептомицина или изониазида, были больше, чем площадь контрольных колоний в отсутствие обоих ПА, что можно объяснить их протекторными свойствами. Таким образом, в присутствии полиаминов эффект уменьшения площади скользящих колоний DMNP превосхо-

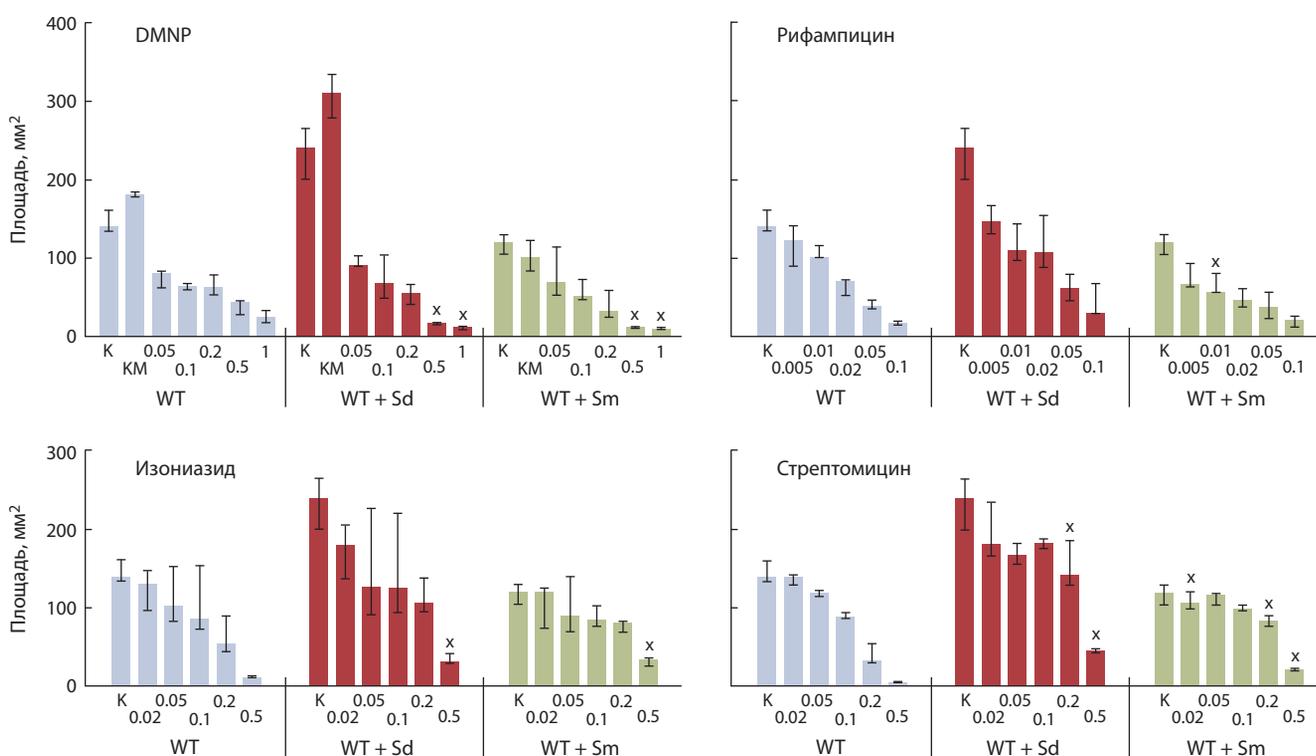


Рис. 6. Совместное влияние полиаминов и антибиотиков на скольжение штамма *M. smegmatis* без делеций.

Здесь и на рис. 7 и 8: KM – контроль с добавкой 50 мкл метанола; Sd – спермидин, 2 мМ; Sm – спермин, 2 мМ.

x Статистически значимое отличие от аналогичной контрольной колонии без ПА (критерий Манна–Уитни, $p \leq 0.05$).

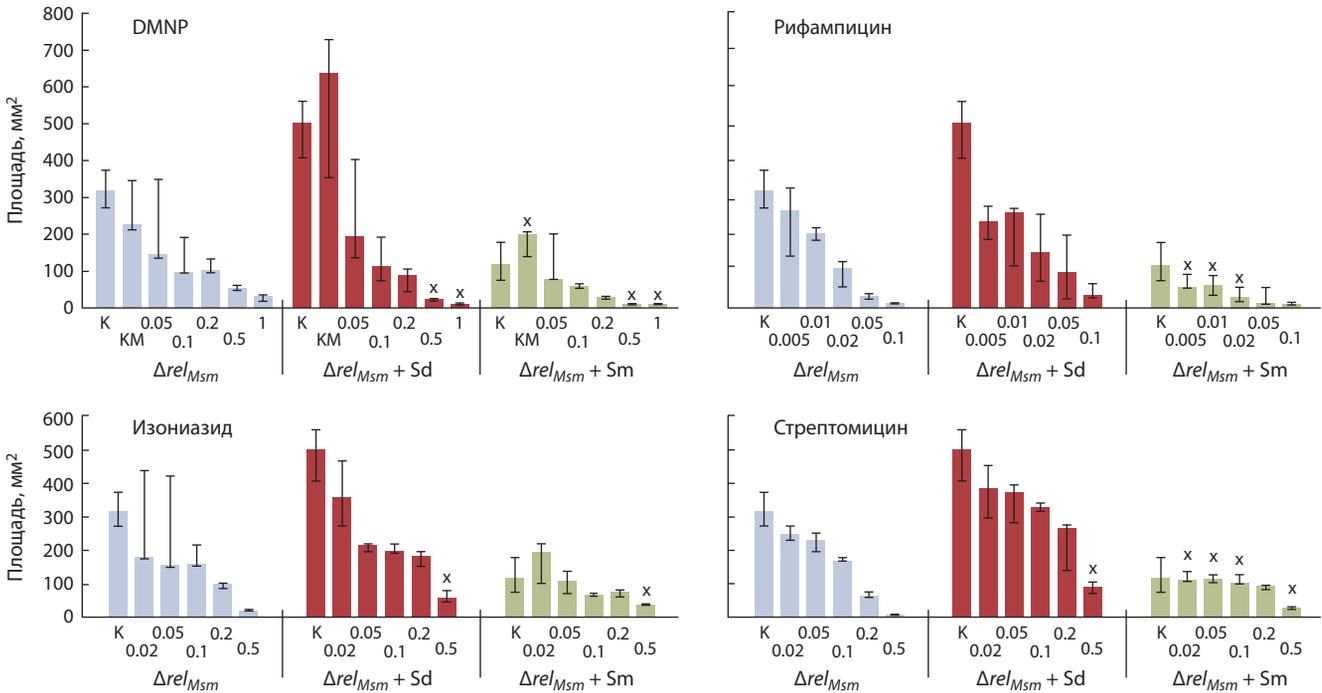


Рис. 7. Совместное влияние полиаминов и антибиотиков на скольжение штамма *M. smegmatis* с делецией гена rel_{Msm} .

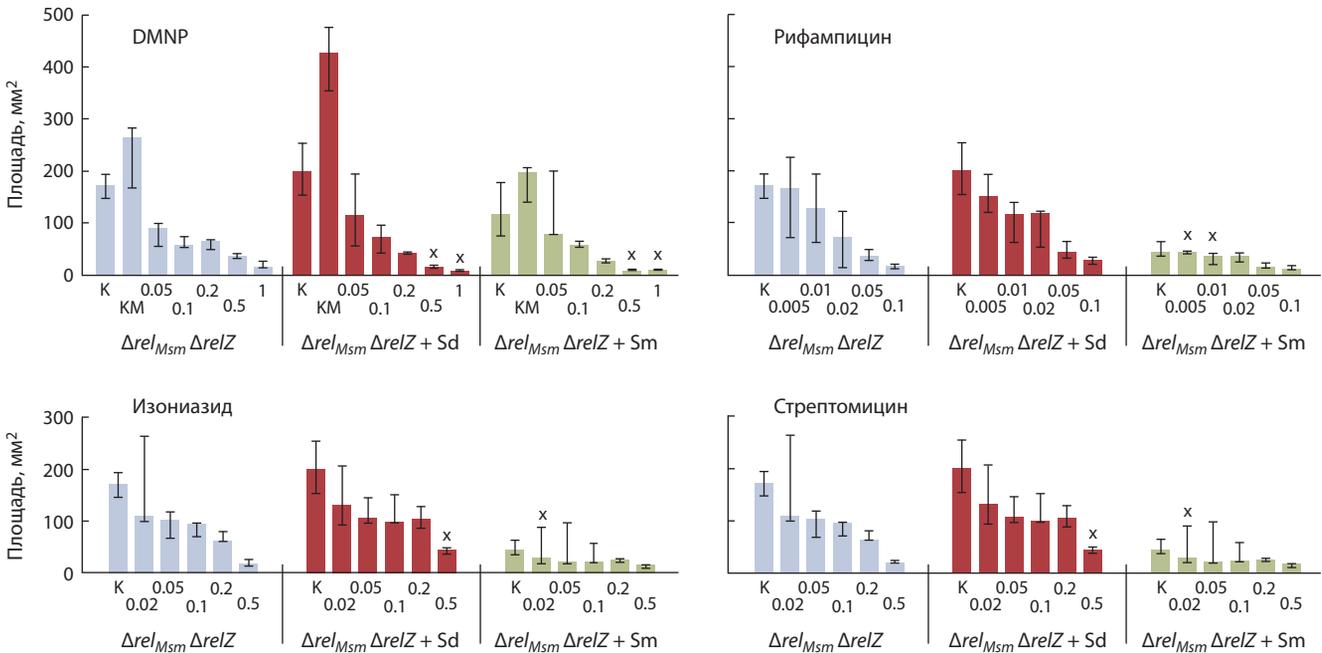


Рис. 8. Совместное влияние полиаминов и антибиотиков на скольжение штамма *M. smegmatis* с двойной делецией генов rel_{Msm} и $relZ$.

дил эффект таких антибиотиков, как стрептомицин и изониазид. Рифампицин сильнее всех способствовал уменьшению площадей колоний штамма без делеций, несмотря на то что в присутствии спермидина эффективность максимальных концентраций антибиотика тоже снижалась (см. рис. 6).

Аналогичная картина наблюдалась для штамма с делецией гена rel_{Msm} (см. рис. 7). Наибольший антибактериальный эффект демонстрировал рифампицин. Спермин

статистически достоверно ограничивал площадь скользящих колоний, усиливая антибактериальное действие минимальных концентраций стрептомицина и рифампицина. Эффективность DMNP возрастала в присутствии обоих полиаминов и, таким образом, превосходила антибактериальный эффект изониазида и стрептомицина при максимальных концентрациях (см. рис. 7).

Совместное действие спермидина и антибиотиков на штамм с двойной делецией генов rel_{Msm} и $relZ$ было ана-

логичным описанному выше (см. рис. 8). В то же время добавление спермина ограничивало скольжение микобактерий при минимальных концентрациях изониазида, стрептомицина и рифампицина. Антибиотик DMNP в присутствии обоих полиаминов сильнее уменьшал площади скольжащих колоний, но на среде без добавок спермидина и спермина эффективность DMNP была ниже, чем у остальных антибиотиков.

Обсуждение

Ключевыми факторами скольжения как пассивного способа движения являются поверхностно-активные вещества, присутствующие в составе клеточных стенок бактерий или выделяемые ими во внешнюю среду. Ранее основными из них считались гликопептидолипиды, которые встроены в клеточную стенку и необходимы микобактериям для скольжения. Однако данные исследований, выполненных нами на штаммах *M. smegmatis*, дефицитных по ГПЛ клеточной стенки (см. рис. 3, б), показали, что образуемые ими колонии превосходят площадь колоний родительского штамма в 1.5–2 раза или не уступают им по площади, несмотря на замедленный рост. Отличием проведенного нами исследования является то, что опытные штаммы с делециями не прекращали полностью синтезировать ГПЛ. Несмотря на это, из-за дефицита ГПЛ гидрофобность клеточной поверхности делеционных штаммов была ниже, чем у родительского, что косвенно подтвердилось при изучении характера дефектов в биопленкообразовании у делеционных штаммов *M. smegmatis* (см. рис. 3, б). Полученные нами результаты позволяют предположить, что ГПЛ – не единственные регуляторы скольжения микобактерий. Для определения полной картины механизма скольжения необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение роли других липидов, входящих в состав клеточной стенки *M. smegmatis* и участвующих в этом процессе.

Разнонаправленность эффекта различных полиаминов на диаметр скольжащих колоний не может быть объяснена только их влиянием на электроотрицательность клеточной поверхности, поскольку оба изученных полиамина имеют положительный заряд. В то же время уменьшение площадей колоний, вызванное спермином, не относится к проявлению антибактериального эффекта и не сопровождается изменением биомассы. Это позволяет предположить, что полиамины способны модулировать скольжение, регулируя внутриклеточные процессы (возможно, выступая в качестве сигнальной молекулы) или напрямую через изменение состава клеточной стенки. Определение механизмов скольжения нуждается в дальнейшем исследовании.

Совместное действие полиаминов и антибиотиков показало, что рифампицин – наиболее эффективный препарат против активно делящихся клеток в колонии. Антибиотик DMNP проявлял наименьшую активность в отношении скольжащих колоний на среде без полиаминов. Тем не менее в присутствии 2 мМ спермидина или спермина эффект антибиотика усиливался независимо от штамма микобактерий и превосходил эффективность стрептомицина и изониазида в аналогичных условиях. Полиамины демонстрировали протекторное действие при максимальных концентрациях стрептомицина и изониазида.

Защитная функция полиаминов была известна ранее (Sarkar et al., 1995). Однако, согласно полученным нами результатам, при минимальных концентрациях рифампицина и стрептомицина наблюдался эффект ограничения скольжения в присутствии спермина. Усиление действия DMNP в присутствии полиаминов обеспечивает данному антибиотику преимущество перед широко используемыми препаратами, поскольку в клетках и тканях многоклеточных находятся полиамины, которые способны влиять на эффективность антибактериальных препаратов.

Заключение

В ходе исследования установлено, что биогенные полиамины спермидин и спермин способны модулировать скольжение микобактерий и демонстрируют разнонаправленный эффект на этот процесс. Спермин сдерживал скольжение при минимальных концентрациях стрептомицина и рифампицина. В то же время оба полиамина усиливали влияние DMNP на диаметр колоний, делая его более эффективным по сравнению со стрептомицином и изониазидом в аналогичных условиях. Показано, что гликопептидолипиды, по-видимому, являются не единственным регулятором скольжения микобактерий. Поэтому исследование механизмов скольжения и природы влияния полиаминов на данный процесс требует дальнейшего изучения.

Список литературы / References

- Замахаев М.В., Григоров А.С., Капрельянц А.С., Шумков М.С. *Mycobacterium smegmatis* обладает активными генами метаболизма полиаминов. *Вестн. Перм. ун-та. Сер. Биология*. 2018;3: 284-291. DOI 10.17072/1994-9952-2018-3-284-291.
- [Zamakhayev M.V., Grigorov A.S., Kaprel'yants A.S., Shumkov M.S. *Mycobacterium smegmatis* possesses active genes of polyamine metabolism. *Vestnik Permskogo Universiteta. Biologiya = Bulletin of the Perm University. Series: Biology*. 2018;3:284-291. DOI 10.17072/1994-9952-2018-3-284-291. (in Russian)]
- Цыганов И.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г. Участие полиаминов в регуляции «поведенческих» реакций микроорганизмов. В: История и методология физиолого-биохимических и почвенных исследований. Сб. науч. тр. по материалам науч. конф., посвящ. 100-летию кафедры физиологии растений и микроорганизмов Перм. гос. нац. исслед. ун-та, Пермь, 18–19 окт. 2017 года. Пермь: Перм. гос. ун-т, 2017:111-112.
- [Tsyganov I.V., Nesterova L.Yu., Tkachenko A.G. Involvement of polyamines in the regulation of “behavioral” reactions of microorganisms. In: History and Methodology of Physiological, Biochemical and Soil Research: Proceedings of the Conference dedicated to the 100th anniversary of the Department of Plant Physiology and Microorganisms, Perm State National Research University, Perm, October 18–19, 2017. Perm: Perm State University, 2017;111-112. (in Russian)]
- Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin. Chim. Acta*. 2004;344(1-2):23-35. DOI 10.1016/j.cccn.2004.02.022.
- Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 1972;36(4):478-503. DOI 10.1128/br.36.4.478-503.1972.
- Hölscher T., Kovács Á.T. Sliding on the surface: bacterial spreading without an active motor. *Environ. Microbiol.* 2017;19(7):2537-2545. DOI 10.1111/1462-2920.13741.
- Kurihara S., Suzuki H., Tsuboi Y., Benno Y. Dependence of swarming in *Escherichia coli* K-12 on spermidine and the spermidine importer. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009;294(1):97-101. DOI 10.1111/j.1574-6968.2009.01552.x.

- Martínez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 1999;181(23):7331-7338. DOI 10.1128/JB.181.23.7331-7338.1999.
- Nolan L.M., Cavaliere R., Turnbull L., Whitchurch C.B. Extracellular ATP inhibits twitching motility-mediated biofilm expansion by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2015;15:55. DOI 10.1186/s12866-015-0392-x.
- Recht J., Martínez A., Torello S., Kolter R. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 2000;182(15):4348-4351. DOI 10.1128/JB.182.15.4348-4351.2000.
- Sarkar N.K., Shankar S., Tyagi A.K. Polyamines exert regulatory control on mycobacterial transcription: a study using RNA polymerase from *Mycobacterium phlei*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995;35:1189-1198.
- Strollo S.E., Adjemian J., Adjemian M.K., Prevots D.R. The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2015;12(10):1458-1464. DOI 10.1513/AnnalsATS.201503-173OC.
- Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V., Vaganov V.Y., Shipilovskikh S.A., Rubtsov A.E., Malkov A.V. A synthetic diterpene analogue inhibits mycobacterial persistence and biofilm formation by targeting (p)ppGpp synthetases. *Cell Chem. Biol.* 2021;28(10):1420-1432.e9. DOI 10.1016/j.chembiol.2021.01.018.
- Tran T., Bonham A.J., Chan E.D., Honda J.R. A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids compared to the tubercle bacillus. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019;115:96-107. DOI 10.1016/j.tube.2019.02.008.
- Zamakhayev M., Tsyganov I., Nesterova L., Akhova A., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Tkachenko A., Shumkov M. *Mycobacterium smegmatis* possesses operational agmatinase but contains no detectable polyamines. *Int. J. Mycobacteriol.* 2020;9(2):138-143. DOI 10.4103/ijmy.ijmy_48_20.

ORCID ID

I.V. Tsyganov orcid.org/0000-0002-5030-7997
A.G. Tkachenko orcid.org/0000-0002-8631-8583

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 18-73-10156.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.03.2022. После доработки 04.05.2022. Принята к публикации 13.05.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Неспецифическая адаптационная реакция байкальского фитопланктона в ответ на антропогенную нагрузку

А.А. Никонова , С.С. Воробьева

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия
 alenaxis@list.ru

Аннотация. Представлены первые результаты по изучению окислительного стресса фитопланктона из озера Байкал и его адаптивных свойств к изменению среды обитания в условиях повышенной антропогенной нагрузки. Анализ фитопланктона, отобранного в поверхностном слое воды (~0.3 м) на прибрежной (глубина 5 м, расстояние от берега 10 м) и пелагической станциях (глубина 543 м, расстояние от берега 1000 м), показал смену доминирующих видов с февраля по июнь 2021 г. В феврале доминировали динофитовые (~40 %), диатомовые (до 33 %) и зеленые (до 12 %) водоросли с низкой биомассой – 100 мг/м³. В марте преобладали золотистые (до 50 %), криптофитовые (до 40 %) и динофитовые (до 30 %) (биомасса 160–270 мг/м³). В апреле наблюдалось увеличение биомассы до 700–3100 мг/м³ с доминированием крупноклеточных динофитовых (до 99 %), золотистых (до 50 %) и криптофитовых (до 35 %) водорослей. К концу первой декады мая доля динофитовых снизилась и увеличилась доля золотистых. Уровень развития диатомовых повышался во второй декаде мая до ~26–38 % при минимальной биомассе фитопланктона (13–30 мг/м³). К июню доля диатомовых в пробах достигала 44–75 % при биомассе 60–550 мг/м³. Окислительный стресс фитопланктона как неспецифическую адаптационную реакцию на длительное, интенсивное либо повторяющееся воздействие стресс-фактора оценивали по содержанию в пробах веществ, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой. Среднее содержание данных веществ – маркеров перекисного окисления липидов – было оценено спектрофотометрически. Окислительный стресс фитопланктона выявлен только в период доминирования в пробах диатомовых водорослей. Это может быть объяснено лучшей адаптацией водорослей других отделов к стресс-фактору. Содержание маркеров перекисного окисления липидов в прибрежном фитопланктоне, отобранном вблизи населенного пункта и крупного туристического центра пос. Листвянка, составило от 100 до 500 мкг/г сухой массы пробы. В 2016 и 2018 гг. в период массового развития диатомовых водорослей обнаружен окислительный стресс фитопланктона вблизи крупных населенных пунктов. В фитопланктоне глубоководных пелагических станций, максимально удаленных от населенных пунктов, стресс не найден. С помощью метода газовой хроматографии показано более низкое (до 15 %) содержание полиненасыщенных жирных кислот в планктоне, характеризующемся наличием стресса. Это свидетельствует о повреждении мембран клеток. Повышенное содержание анионных синтетических поверхностно-активных веществ, а именно алкилбензолсульфонатов натрия, являющихся компонентами моющих средств и вызывающих окислительный стресс гидробионтов, обнаружено в поверхностной воде оз. Байкал (до 30 ± 4 мкг/дм³). Наличие данных соединений в водной экосистеме может приводить к истощению ресурсов фитопланктона, нарушению гомеостаза, стрессу, патологическим изменениям и перестройкам планктонного сообщества. Ключевые слова: Байкал; окислительный стресс фитопланктона; стресс диатомовых; алкилбензолсульфонаты; тиобарбитуровая кислота; адаптационная реакция фитопланктона.

Для цитирования: Никонова А.А., Воробьева С.С. Неспецифическая адаптационная реакция байкальского фитопланктона в ответ на антропогенную нагрузку. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):467-476. DOI 10.18699/VJGB-22-57

Nonspecific response of Lake Baikal phytoplankton to anthropogenic impact

A.A. Nikonova , S.S. Vorobyeva

Limnological Institute of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia
 alenaxis@list.ru

Abstract. In this study, we present the first results on oxidation stress in Lake Baikal phytoplankton and its adaptation to environmental changes under anthropogenic impact. As was shown, the changing of the dominant species of phytoplankton collected from the surface water layer (~0.3 m) took place from February to June 2021. Phytoplankton were collected at a nearshore station (a littoral station at a distance of ~0.01 km from the shoreline, depth to bottom is ~5 m) and an offshore station (a pelagic station at a distance of ~1 km from the shoreline, depth to bottom is ~543 m). In February, dinoflagellates were dominant (~40 %) as well as diatoms (≤33 %) and green algae (≤12 %). Their biomass was 100 mg·m⁻³. In March, chrysophytes were dominant (up to 50 %) as well as cryptophytes (≤43 %) and dinoflagellates (≤30 %). Their biomass was 160–270 mg·m⁻³. In April, biomass increased up to 700–3100 mg·m⁻³ with the dominance of

large cell dinoflagellates (up to 99 %), chrysophytes (up to 50 %), and cryptophytes (up to 35 %). By the end of the first decade of May, the percentage of dinoflagellates decreased and that of cryptophytes increased. In the second decade of May, the percentage of diatoms increased up to ~26–38 % but phytoplankton biomass was minimal (13–30 mg·m⁻³). By June, the percentage of diatoms in the samples reached 44–75 % at 60–550 mg·m⁻³. The oxidation stress of phytoplankton as a nonspecific adaptive response to a prolonged, intensive, or recurrent effect of a stress factor was estimated from the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The mean content of these substances (markers of the lipid peroxidation) was determined spectrophotometrically. The oxidation stress of phytoplankton was revealed only when diatom algae dominated. It can be explained by adaptation of algae of other classes to the stress factor. The content of the lipid peroxidation markers in the coastal phytoplankton collected close to the settlement of Listvyanka known as a large touristic center was estimated from 100 to 500 µg·g⁻¹ of dry weight of sample. During the period of diatom blooming in 2016 and 2018, oxidation stress of phytoplankton collected near large settlements was found. In phytoplankton from deep-water pelagic stations most remote from settlements, stress was not revealed. Using the method of gas chromatography, we showed a lower (up to 15 %) content of polyunsaturated fatty acids in phytoplankton characterized by stress occurrence. This confirms cell membrane damages. In Lake Baikal surface water, we found a higher content of synthetic anionic surfactants (sodium alkylbenzene sulfonates), which are components of detergents and cause oxidation stress of hydrobionts (up to 30 ± 4 µg·L⁻¹). The presence of these substances in a water ecosystem can result in exhausting of phytoplankton cell resources, homeostasis imbalance, stress, pathological changes, and rearrangements in phytoplankton assemblage.

Key words: Baikal; phytoplankton oxidation stress; stress response in diatoms; alkylbenzene sulfonates; TBARS, adaption of phytoplankton.

For citation: Nikonova A.A., Vorobyeva S.S. Nonspecific response of Lake Baikal phytoplankton to anthropogenic impact. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):467-476. DOI 10.18699/VJGB-22-57

Введение

При действии внешних факторов на живую клетку и организм в целом развивается комплекс неспецифических и специфических адаптационных реакций. Неспецифические адаптационные реакции организма, или стресс, являются откликом системы на чрезвычайные непривычные раздражители и позволяют оценить масштаб воздействия тех или иных стрессовых факторов. Адаптивный механизм в данном случае подразумевает активацию систем организма, противодействующих стресс-фактору и поддерживающих гомеостаз и динамическое равновесие организма с внешней средой. Сила воздействия химических стресс-факторов на клетку определяется, с одной стороны, характеристиками этих факторов (концентрация и физико-химические свойства молекул), с другой – индивидуальной реакцией субъектов экосистемы, их адаптационными возможностями и ресурсами. При длительном, повторяющемся либо интенсивном воздействии может наступить срыв приспособительных реакций организма. Это ведет к исчерпанию ресурсов, нарушению гомеостаза, состоянию дистресса и патологическим изменениям (Порядин, 2009).

Поступление в водоемы ксенобиотиков, к воздействию которых не выработаны устойчивые адаптационные механизмы, стало острой проблемой нынешнего века. Одни из наиболее распространенных стойких микрополлютантов водных экосистем – полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) (Vega-López et al., 2013) и тяжелые металлы (Srivastava et al., 2006). К макрополлютантам отнесены анионные синтетические поверхностно-активные вещества (АСПАВ), а именно алкилбензолсульфонаты (Lewis, 1991; Jorgensen, Christoffersen, 2000). Все эти соединения объединяет их способность вызывать окислительный стресс и гипоксию на уровне клетки и организма в целом.

Индикатором окислительного стресса как неспецифической адаптационной реакции организма служит актив-

ность ферментов-индикаторов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, возрастающая при начальных или незначительных стрессовых состояниях. При длительном или интенсивном воздействии стресс-фактора ферментный механизм может блокироваться, вызывая заболевание организма и его гибель. Другими индикаторами окислительного стресса являются альдегиды, в том числе малоновый диальдегид, образование которых обусловлено повреждением липидов клеточных мембран активными формами кислорода (перекисное окисление липидов) (Marnett, 1999; Hampel et al., 2008; Goncalves et al., 2017; Zhou et al., 2018; Nikonova et al., 2022).

Микроорганизмы водных экосистем, например фитопланктон, снабжены возможностью активации защитных систем: гормональной, адениннуклеотидной, простагландиновой и антиоксидантной. Последняя наиболее изучена и позволяет противостоять влиянию природных физико-химических факторов, хотя не всегда справляется с воздействием ксенобиотиков (Karthikeyan et al., 2013). Фитопланктон крайне чувствителен к изменениям условий окружающей среды, от его благополучия зависит состояние всей экосистемы.

Особое внимание следует уделить диатомовым водорослям, которые являются прекрасными индикаторами качества вод и используются при биомониторинге тяжелых металлов и органических загрязнителей – нефтяных и полиароматических углеводородов, пестицидов, полихлорированных бифенилов (ПХБ) и АСПАВ (Datta et al., 2019). Это связано с тем, что диатомеи обитают во всех водных экосистемах. Несмотря на широкий спектр видов, многие из них встречаются в различных типах водоемов и распространены по всему земному шару, что позволяет проводить сравнительный анализ результатов. Диатомовые водоросли быстро отвечают как на краткосрочные, так и на продолжительные физико-химические изменения окружающей среды (Dixit et al., 1992). Разные

виды диатомей обладают различной чувствительностью к тем или иным изменениям (Datta et al., 2019), таким как эвтрофикация (*Eunotia* sp., *Diatoma vulgare*, *Gomphonopsis herculeana*, *Achnantheidium* sp., *Achnanthes subhudsonis* var. *kraeuselii*), колебания электропроводности (*Fragilaria ulna* var. *acus* (Kütz.) Lange-Bert.), загрязнение органическими соединениями (*Nitzschia palea*, *Nitzschia fonticola*) и тяжелыми металлами (*Fragilaria capucina*, *Achnantheidium minutissimum*), изменение pH среды (*Eunotia* sp., *Pinnularia* sp., *Eunotia exigua*, *Gomphonema angustum*, *Amphora veneta*, *Gomphonema rautenbachiae*), скорость течения (*Melosira* sp., *Cocconeis* sp.), поступление осадочного материала (*Navicula* sp., *Nitzschia* sp., *Surirella* sp.), концентрация нутриентов азота (*Gomphonema parvulum*, *Eolimna minima*, *Nitzschia palea*) и фосфора (*Gomphonopsis herculeana*, *Achnantheidium* sp., *Achnanthes subhudsonis* var. *kraeuselii*, *Luticola goeppertiana*, *Navicula recens*, *Nitzschia inconspicua*, *Nitzschia palea*, *Rhopalodia* sp., *Eunotia* sp.) и др.

Озеро Байкал – самое глубокое и самое древнее рифтовое озеро, содержащее 23 615.39 км³ ультрапресной воды с общей минерализацией 96–98 мг/л. Строение его котловины таково, что при площади поверхности 32 822 км² на долю литорали приходится всего ~3.4 %. Литораль сосредоточивает максимальное биоразнообразие видов (>98 %) с биомассой ~100–620 кг/га на глубинах менее 4–70 м. Фитопланктон населяет литораль и пелагиаль озера вплоть до глубин ~750 м при его максимальной численности в фотической зоне с глубинами до 60–120 м и в зоне максимального ветрового перемешивания – до 200–300 м. Первичная продукция фитопланктона в весенний период достигает 160 т/га (Вотинцев и др., 1975; Nikonova et al., 2022). В водной толще озера зарегистрировано около 200 видов планктонных водорослей, из них свыше 50 – это диатомовые (Вотинцев и др., 1975; Байкаловедение, 2012), на долю которых приходится 50–90 % всей биомассы фитопланктона (Popovskaya et al., 2015). Литораль по сравнению с пелагиалью в большей степени подвергается неблагоприятному воздействию человека. Уже с 2000 г. отмечаются изменения в составе прибрежного фитопланктона (Bondarenko, Logacheva, 2017), в 2019 г. впервые обнаружен его окислительный стресс, причины которого пока однозначно не установлены (Nikonova et al., 2022).

Целью нашего исследования была оценка неспецифической адаптационной реакции фитопланктона оз. Байкал в ответ на антропогенную нагрузку и оценка возможности его использования в качестве биоиндикатора.

Материалы и методы

Отбор проб воды для оценки состава фитопланктона. Были выбраны три типа станций: прибрежные станции (глубина до дна не более 30 м); ближняя пелагиаль (расстояние от берега до 1–3 км); центральные станции (расстояние от берега до 10–30 км, одинаковое до восточного и западного берега).

Отбор осуществляли в подледный период (третья декада февраля – первая декада мая) и в открытый период (третья декада мая – первая декада июня) в 2021 г. Систематический отбор проб фитопланктона в поверхностной воде (до 0.5 м) проводили на прибрежной (глубина до дна

5 м, расстояние от берега 10 м) и ближней пелагической (глубина до дна 543 м, расстояние от берега 1000 м) станциях. Стационарные станции были расположены в заливе Лиственничный напротив р. Сенная в южной котловине озера. Кроме того, были взяты пробы фитопланктона в трех котловинах оз. Байкал в 2016 и 2018 гг. Пробы воды объемом 1 дм³ отбирали в бутылки вместимостью 1 дм³, фиксировали раствором Утермеля (Люголя), концентрировали классическим способом осаждения клеток (Nakashizuka, Stork, 2002) в течение 10 дней в темноте при комнатной температуре. Концентрированные растворы использовали для оценки видового состава, подсчета численности и биомассы.

Отбор сетевых проб фитопланктона. С целью последующего биохимического анализа параллельно с пробами, необходимыми для идентификации фитопланктона, отбирали сетевые пробы. Для этого использовали сеть Джеди (100 мкм). Пробы со стационарных станций доставляли в лабораторию в термосах живыми и фильтровали на фильтрах из микроцеллюлозы с диаметром пор 0.45 мкм (ЗАО «Владисарт», Россия) с использованием фильтр-аппарата Duran (Duran Group, Германия). Отбор навесок биомассы на анализ маркеров перекисного окисления липидов и их анализ делали незамедлительно. Оставшуюся биомассу сразу после фильтрования помещали в пластиковые микропробирки и замораживали при –70 °С. Пробы, которые невозможно было доставить в лабораторию живыми, фильтровали и замораживали при –20 °С, затем транспортировали в лабораторию и хранили при –70 °С до анализа.

Микроскопия и оценка количественных характеристик фитопланктона. В сконцентрированной пробе фитопланктон идентифицировали с использованием светового микроскопа Amplival (Carl Zeiss, Jena) при увеличении ×800. Диагностирование видов велось согласно определителям видов (Матвиенко, Литвиенко, 1977; Starmach, 1985; Царенко, 1990; Round et al., 1990; Глезер и др., 2011). Подсчет численности (*N*, тыс. клеток/см³) проводили в камере объемом 0.1 см³ по формуле

$$N = \frac{\bar{N} \cdot 10 \cdot V_2 \cdot 1000}{V_1 + V_2},$$

где \bar{N} – средняя численность в камере; V_1 – объем декантированной воды; V_2 – объем сконцентрированной пробы.

Численность клеток переводили в биомассу (*B*) с учетом индивидуальных формы, размера, объема клетки для каждого таксона (Макарова, Пичкилы, 1970; Белых и др., 2011).

Отбор проб воды для оценки концентраций АСПАВ.

Пробы поверхностной воды (до 0.5 м) из оз. Байкал объемом 0.1 дм³ с глубины ≤0.5 м отбирали с 30 мая по 18 июня 2021 г. в бутылки темного стекла вместимостью 0.1 дм³, фиксировали перегаданным этиловым спиртом (1 см³). Параллельно были взяты пробы воды для идентификации фитопланктона. Кроме того, исследовали образцы воды (30 марта–18 апреля 2021 г.) из устьев рек Сенная, Банная ручей, Крестовка, Малая Черемшанка и Большая Черемшанка, впадающих в зал. Лиственничный оз. Байкал. Воду пропускали через фильтры из микроцеллюлозы с диаметром пор 0.45 мкм (ЗАО «Владисарт») с использованием фильтр-аппарата, после чего фильтр со взвесью разрезали,

помещали в стеклянный пенициллиновый флакон (НС-3, ФО-10) вместимостью 10 см³ (далее – стеклянный флакон), добавляли 1 см³ перегнанного этилового спирта и экстрагировали в ультразвуковой ванне (УЗВ) 5 мин. Экстракт центрифугировали в пластиковых пробирках типа Eppendorf при 13 000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант объединяли с профильтрованной пробой воды. Пробы хранили при +3 °С до анализа.

Идентификация алкилбензолсульфонатов натрия в пробах воды. Идентификацию гомологов алкилбензолсульфонатов в экстрактах проб воды, сконцентрированных на патронах с обращенно-фазовым сорбентом DSC-18 (0.5 г, Supelco, США), выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Как внешний стандарт был взят ГСО 8578-2004 состава алкилбензолсульфонат натрия (100 мг/см³, раствор в воде, ООО «Аналитик-Хим», Россия). Хроматографию проводили с использованием хроматографа «Милихром А-02» при 60 °С на колонке (2×75 мм) с сорбентом Nucleosil 100-5-С₁₈ (ООО «ЭкоНова», Россия). В качестве элюентов использовали 0.1 % раствор трифторуксусной кислоты (ТФУ) в дистиллированной воде (элюент А) и 0.1 % раствор ТФУ в ацетонитриле (элюент Б). Элюирование 40 % Б (300 мкл), затем градиент до 100 % Б (2000 мкл). Объем вводимой в колонку пробы 100 мкл. Детектирование вели при 224 и 230 нм.

Количественное определение АСПАВ в пробах воды из оз. Байкал и его притоков проводили спектрофотометрическим методом с метиленовым синим. Пробы объемом 50 см³ экстрагировали хлороформом согласно способу, описанному ранее (Nikonova et al., 2022), и анализировали на двухлучевом призмном спектрофотометре Cintra-20 (GBC Scientific Equipment Ltd., Австралия) с монохроматором Черни–Тернера и голографической дифракционной решеткой, что обеспечило высокую чувствительность и точность получаемых результатов. Длина оптического пути равна 1 см.

Качественный и количественный анализ жирных кислот. Для экстракции жирных кислот (ЖК) использовали смесь Фолча (хлороформ:метанол = 2:1 по объему) в УЗВ (1.2 мл × 3 × 5 мин) согласно работам, описанным ранее (Никонова и др., 2020; Nikonova et al., 2022). Добавляли воду до соотношения растворителей хлороформ:метанол:вода = 2:1:1, встряхивали, центрифугировали при 3000 об/мин. Супернатант переносили в стеклянные флаконы. Растворитель отгоняли в токе аргона досуха. Добавляли 4.5 мл 2 %-го раствора Н₂SO₄ в метаноле. Эстерификацию ЖК проводили при 55 °С в течение 1.5 ч. Метиловые эфиры ЖК (МЭЖК) из растворов экстрагировали *n*-гексаном (3 мл × 2 × 2 мин). Экстракты осушали безводным Na₂SO₄. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор дидецилового эфира в *n*-гексане с концентрацией 1 мг/мл. Жирные кислоты (сумму свободных и эстерифицированных ЖК) анализировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим и пламенно-ионизационным детектированием на оборудовании 6890В GC System, 7000С GC/MS Triple Quad (Agilent, США) и GC-2010 Plus (Shimadzu, Япония) с колонками Optima-17MS (30 м × 0.25 мм, Macherey-Nagel, Германия).

Окислительный стресс фитопланктона оценивали по наличию в биомассе фитопланктона веществ, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для подготовки проб массой 0.15–0.20 г использовали известный аналитический подход (Haraguchi et al., 1997; Al-Rashed et al., 2016) с модификациями (Nikonova et al., 2022). Анализ осуществляли на спектрофотометре Cintra-20.

Результаты

В фитопланктоне прибрежной (глубина 5 м, расстояние от берега 10 м) и пелагической (глубина 543 м, расстояние от берега 1000 м) стационарных станций за исследуемый период (с 23 февраля по 26 мая 2021 г.) идентифицировано 39 таксонов планктонных водорослей и 21 таксон бентосных из 20 родов. Среди планктонных выявлено: золотистых – 5 таксонов, синезеленых – 3, криптофитовых – 4, динофитовых – 7, диатомовых – 11, зеленых – 8, эвгленовых – 1 таксон. Всего отобрано 23 пробы.

За указанный период в прибрежной зоне отмечено заметное колебание биомассы планктонных водорослей – от 13.4 до 3111 мг/м³ и смена доминирующих видов. В феврале преобладали динофитовые (~40 %) *Gymnodinium baicalense* и *Peridinium baicalense*, диатомовые (до 33 %) *Synedra acus* subsp. *radians* и зеленые водоросли (до 12 %) *Monoraphidium arcuatum*. Общие показатели биомассы (102 мг/м³) и численности (100 тыс. кл/дм³) были низкими. В марте произошла смена доминант на золотистые водоросли *Dinobryon cylindricum* (25–50 %), криптофитовые *Rhodomonas pusilla* (15–36 %) и динофитовые (~30 %). Биомасса достигала 160–270 мг/м³, численность – 130–170 тыс. кл/дм³.

Максимальные значения общей биомассы (3110 мг/м³) и численности фитопланктона (1030 тыс. кл/дм³) отмечены в апреле. До третьей декады апреля доминировали динофитовые (92–99 %) *G. baicalense* и *P. baicalense*. Высокая биомасса сохранялась до конца первой декады мая (930 мг/м³) и определялась золотистыми (~63 %), криптофитовыми (~18 %), диатомовыми (~16 %).

К концу третьей декады мая биомасса снизилась до минимальных значений (13–30 мг/м³). Произошло снижение уровня развития фитопланктона и изменение структуры сообщества с преобладанием диатомовых (30–40 %) и криптофитовых водорослей (20–30 %), в отличие от золотистых (13–20 %), динофитовых (~15 %), зеленых (6–16 %).

В пелагической зоне в конце марта количественные показатели фитопланктона были невысокие: $N = 35$ тыс. кл/дм³, $B = 93$ мг/м³. Преобладали динофитовые (до 50 %), криптофитовые (до 30 %) и золотистые (до 20 %). К концу первой декады апреля доминировали динофитовые (до 90 %) *G. baicalense* и *P. baicalense* при общих значениях численности и биомассы 100 тыс. кл/дм³ и 900 мг/м³ соответственно. К середине апреля доминирующие виды сохранялись при увеличении N (200 тыс. кл/дм³) и B (1600 мг/м³).

В начале июня на стационарных станциях преобладали диатомовые водоросли (до 80 %). Подробный видовой состав байкальского фитопланктона, отобранного в зал. Лиственничный в период массового цветения диатомовых водорослей, приведен в табл. 1. Рост количественных характеристик (численности, биомассы и доли от

Таблица 1. Состав байкальского фитопланктона зал. Лиственничный (05.06.2021) и его количественные показатели – численность *N* (тыс. кл/дм³) и биомасса *B* (мг/м³)

Таксон	Станции отбора проб							
	1		2		3		4	
	<i>N</i>	<i>B</i>	<i>N</i>	<i>B</i>	<i>N</i>	<i>B</i>	<i>N</i>	<i>B</i>
Отдел Chrysophyta								
<i>Dinobryon cylindricum</i>	8.3	16	23	44	0.8	1.52	7.2	14
<i>Chrysochromulina parva</i>	2.7	0.14	24	1.2	7.0	0.35	2.9	0.15
Cysts of Chrysophyta	2.4	1.2	12.2	6.1	11.2	5.6	1.5	0.75
<i>Chryso-sphaera melosira</i>	–	–	–	–	–	–	0.16	0.02
Сумма	13	17	60	51	19	7.5	12	15
Отдел Cryptophyta								
<i>Rhodomonas pusilla</i>	2.7	0.59	12	2.7	8.4	1.8	5.1	1.12
<i>Cryptomonas</i> sp. 1	5.1	14	14	40	1.7	4.8	0.96	2.7
<i>Cryptomonas</i> sp. 2	0.08	0.20	0.75	1.9	–	–	0.06	0.15
Сумма	7.9	15.1	27	45	10	6.6	6.1	4.0
Отдел Dinophyta								
<i>Gyrodinium helveticum</i>	0.53	11	0.6	12	0.56	11.2	0.40	8.0
<i>Peridinium baicalense</i>	–	–	–	–	0.16	5.6	–	–
<i>Glenodinium</i> sp. 1	0.75	1.13	0.6	0.9	1.12	1.68	1.04	1.6
<i>Glenodinium</i> sp. 2	–	–	0.3	1.1	–	–	0.40	1.4
Сумма	1.28	12	1.5	14	1.8	18.5	1.8	11
Отдел Bacillariophyta								
<i>Aulacoseira baikalensis</i>	–	–	–	–	–	–	0.04	0.6
<i>Aulacoseira islandica</i>	2.0	9.2	11	48	0.32	1.47	0.88	4.1
<i>A. islandica</i> , споры	0.15	0.6	0.45	1.8	–	–	0.28	1.12
<i>Synedra acus</i> subsp. <i>radians</i>	3.2	6.1	33	63	11.2	21	3.6	6.8
<i>Synedra ulna</i> var. <i>danica</i>	–	–	–	–	–	–	0.08	0.26
<i>Synedra ulna</i>	–	–	–	–	–	–	0.04	0.09
<i>Nitzschia graciliformis</i>	2.1	0.53	2.1	0.53	0.32	0.08	0.12	0.03
<i>Cyclotella minuta</i>	0.75	1.58	1.1	2.31	0.48	1.0	0.64	1.34
<i>Cyclotella baicalensis</i>	0.23	3.9	0.08	1.36	0.08	1.36	0.04	0.68
<i>Stephanodiscus meyeri</i>	29	15	397	199	3.1	1.56	155	78
<i>Stephanodiscus</i> sp.	0.08	0.04	–	–	–	–	0.40	0.20
<i>Asterionella formosa</i>	0.08	0.05	–	–	–	–	–	–
Сумма	38	37	444	316	16	27	161	93
Отдел Chlorophyta								
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	0.75	0.21	12	3.4	2.8	0.78	2.2	0.62
<i>Monoraphidium contortum</i>	0.08	0.01	–	–	–	–	–	–
<i>Chlamydomonas</i> sp.	–	–	1.05	0.47	–	–	–	–
Сумма	0.8	0.2	13	3.9	2.8	0.8	2.2	0.6
Отдел Euglenophyta								
<i>Euglena</i> sp.	–	–	0.08	0.26	–	–	–	–
Сумма	–	–	0.08	0.26	–	–	–	–
Сумма всех отделов	61	81	546	429	49	60	183	123

Примечание. Станции отбора проб: 1–3 – прибрежные, 4 – пелагическая.

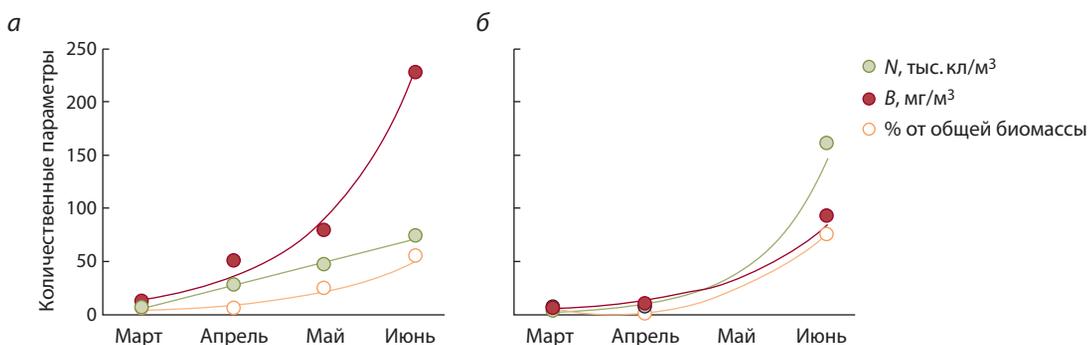


Рис. 1. Рост количественных характеристик (численности, биомассы и процентного содержания от общей биомассы) прибрежного (а) и пелагического (б) фитопланктона в 2021 г.

Таблица 2. Содержание продуктов перекисного окисления липидов (мкг/г сухой массы пробы) в пробах фитопланктона стационарных станций

Номера проб (число проб $m = 6$)	Число навесок (число членов в выборке, n)									Среднее
	1			2			3			
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
Пелагическая станция (1 км от берега, напротив р. Сенная)										
1	0	0	0	140	149	158	0	0	0	50 ± 6
2	28	39	49	0	0	0	0	0	0	12.9 ± 1.7
Прибрежная станция 1 (напротив р. Сенная, 1 км от пос. Листвянка)										
3	67	85	85	298	328	282	328	351	359	240 ± 30
4	122	142	136	60	41	60	185	163	177	121 ± 16
Прибрежная станция 2 (напротив р. Малая Черемшанка, пос. Листвянка)										
5	884	884	884	323	350	403	643	656	669	630 ± 80
6	379	379	379	139	165	148	1096	1106	1106	540 ± 70

общей биомассы) диатомовых водорослей байкальского фитопланктона, отобранного в зал. Лиственничный в весенний период 2021 г., показан на рис. 1.

В биомассе сетных проб фитопланктона, отобранных в марте и апреле, до начала массового развития диатомовых водорослей, не обнаружено продуктов перекисного окисления липидов (ППОЛ). С началом массового цветения диатомовых водорослей в биомассе пелагического фитопланктона ППОЛ в ряде проб не найдены (число проб $m = 4$), а в двух пробах их содержание было минимальным и составляло 13 и 50 мкг/г сухой массы. В биомассе прибрежного фитопланктона количество ППОЛ оценивалось средними значениями от 120 до 630 мкг/г сухой массы. Прибрежный фитопланктон был отобран на двух станциях: стационарной станции 1 напротив р. Сенная и станции 2 напротив пос. Листвянка. На каждой из двух прибрежных станций, как и на пелагической, было отобрано по две независимых сетных пробы фитопланктона. Из каждой пробы брали по три навески без предварительной гомогенизации образца с целью дальнейшей оценки

неоднородности содержания аналитов в материале пробы. На станции 1 отмечено повышение уровня окислительного стресса фитопланктона по содержанию маркеров в диапазоне значений от 120 до 240 мкг/г, на станции 2 – от 540 до 630 мкг/г (табл. 2).

В 2016 и 2018 гг. в первой декаде июня в трех котловинах оз. Байкал отобран фитопланктон ($m = 20$) с доминированием диатомовых *S. acus* subsp. *radians* (92–95 %) (рис. 2). Биомасса других диатомей и золотистых водорослей не превышала 5 %, что позволило провести сравнительный анализ проб с разных станций. Пелагические станции были расположены по центру разрезов озера ($m = 3$). Прибрежные станции разделены на фоновые ($m = 4$) и расположенные вблизи городов и крупных поселков ($m = 9$). Кроме того, проанализирована аксеничная лабораторная культура *S. acus* subsp. *radians* ($m = 3$) (табл. 3). Содержание маркеров окислительного стресса в прибрежном фитопланктоне варьировало от 14 до 340 мкг/г. В фитопланктоне центральных пелагических станций данные маркеры не найдены.

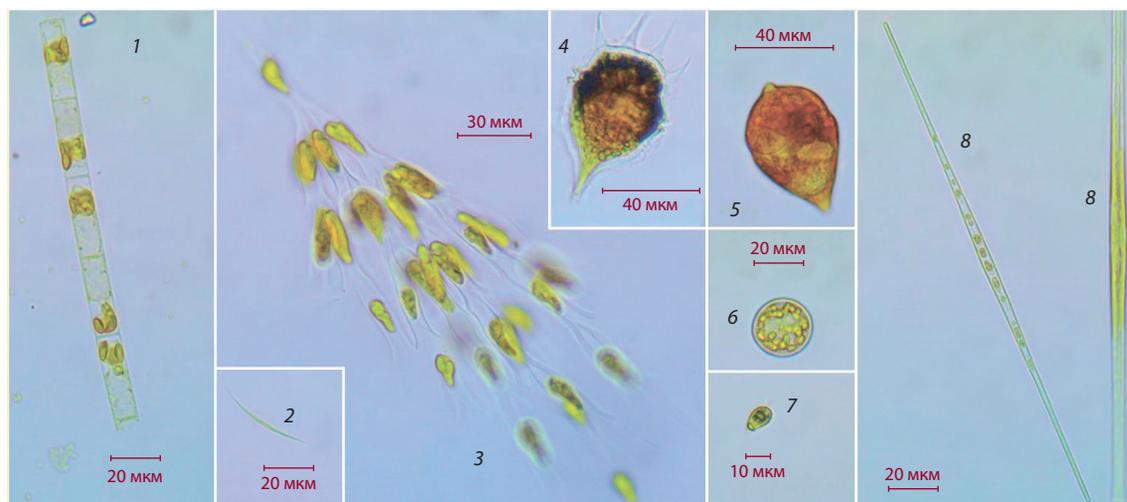


Рис. 2. Представители весеннего комплекса байкальского фитопланктона из зал. Лиственничный: 1 – *A. islandica*, 2 – *Koliella longista*, 3 – *D. cylindricum*, 4 – *Peridinium baicalense*, 5 – *G. helveticum*, 6 – *C. minuta*, 7 – *Rh. pusilla*, 8 – *S. acus* subsp. *radians*. Фотографии получены с использованием светового микроскопа ЛОМО Микромед-6 при увеличении $\times 400$.

Таблица 3. Содержание ненасыщенных жирных кислот и маркеры окислительного стресса в пробах фитопланктона с доминированием диатомей

Район отбора	Год отбора	Зона озера	Σ ЖК, мг/г	неНЖК, %	ППОЛ, мкг/г
Разрез р. Солзан–р. Маритуй	2016	Пелагиаль	16	72	0
Разрез мыс Лударь–р. Фролиха	2016		17	72	0
Разрез мыс Елохин–пос. Давша	2016		24	70	0
Среднее				71	0
Бухта Ая	2016	Прибрежная, на удалении от поселений	28	66	0
Мыс Лударь	2016		49	68	0
Бухта Шаманка	2016		29	60	14
Мыс Елохин	2016		18	55	14
Среднее				62	7
Пос. Култук	2016	Прибрежная, вблизи крупных поселений	24	56	80
	2018		21	56	100
Город Байкальск	2016		27	58	280
	2016		27	58	340
Город Байкальск, район Байкальского целлюлозно-бумажного комбината	2016		26	60	160
	2018		21	54	164
Напротив устья р. Тья, в которую поступают стоки Северобайкальска	2016		27	46	100
	2018		16	58	11
Бухта Сеногда, 8 км от устья р. Тья	2016		14	40	190
Среднее				54	158
Лабораторная культура <i>S. acus</i>			35	74	0

Примечание. Предел обнаружения 0.5 мкмоль/мл (Rakita et al., 2020); неНЖК – моно- и полиненасыщенные жирные кислоты.

Во всех пробах воды обнаружены АСПАВ, качественный состав которых представлен гомологами алкилбензолсульфоната натрия (рис. 3). Концентрация АСПАВ в прибрежной воде в районе крупных поселений достигала 21 ± 3 мкг/дм³, в воде фоновых прибрежных станций

не превышала 10 мкг/дм³, в воде центральных пелагических станций была не более 5 мкг/дм³. В воде притоков АСПАВ найдены в широком интервале значений: Бол. Черемшанка – 12.6 ± 1.5 мкг/дм³, Мал. Черемшанка – 8.1 ± 1.0 , Крестовка – 74.5 ± 9.0 , Банный ручей – 14.8 ± 1.8 ,

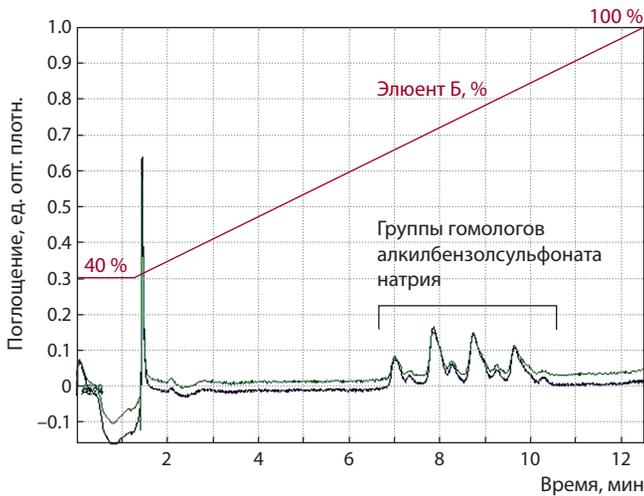


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма гомологов алкилбензолсульфоната натрия в воде из зал. Лиственничный (апрель 2022 г.).

Идентификация проведена в соответствии с аттестованной методикой ФР.1.38.2017.27043 измерений массовой концентрации алкилбензолсульфоната натрия (сульфонола) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием.

Сенная – 30.1 ± 3.7 мкг/дм³. Река Крестовка находится непосредственно в пос. Лиственянка и характеризуется максимальным стоком и концентрациями АСПАВ в воде.

Обсуждение

На оз. Байкал, учитывая океаничность климатических условий и задержку сезонов по сравнению с прилегающей континентальной зоной, июнь относится к весенним месяцам (Ладейщиков, 1987). Анализ фитопланктона в весенний период (март–июнь) 2021 г. на стационарных станциях показал четкую смену доминирующих видов с увеличением доли диатомовых от 5 % в марте–апреле до 44–75 % в первой декаде июня, что характерно для оз. Байкал и отмечено ранее (Vorobyeva, 2018).

Для планктонного сообщества Байкала с доминированием *Synedra acus* subsp. *radians* характерно высокое содержание мононенасыщенных и полиненасыщенных ЖК. Превалируют С18:3- ω -3 (~7–9 %) и С20:5- ω -3 жирные кислоты (~10–23 %, в среднем 17 %). В небольших количествах представлены С20:4- ω -6 и С22:6- ω -3 (Никонова и др., 2020). Именно эти кислоты в первую очередь подвержены воздействию свободных радикалов. Полиненасыщенные ЖК большей частью находятся в составе липидного бислоя клеточных мембран. Клеточная мембрана *S. acus* на 30 % состоит из них и покрыта кремнистой оболочкой, что делает ее уязвимой к воздействию свободных радикалов.

Известны два пути деструкции липидов в клетке – ферментативное α -, β - и ω -окисление липидов с образованием жизненно необходимых соединений и перекисное окисление ЖК с образованием перекисных соединений и альдегидов, включая токсичный малоновый диальдегид (МДА). Перекисное окисление ненасыщенных ЖК происходит при атаке свободными радикалами реакционно-активных атомов водорода метиленовой группы в алкильной цепи, находящейся в сопряжении с двумя двойными связями. Образовавшийся пероксид-радикал жирной кислоты вовлекает в процесс новую молекулу жирной кислоты (рис. 4).

Неспецифические адаптационные реакции – это такие реакции клетки или организма в ответ на действие стресс-фактора с целью поддержания гомеостаза, которые являются общими для разных организмов. В частности, к ним относится окислительный стресс. Например, сообщается об окислительном стрессе зеленых водорослей при воздействии радиации (Al-Rashed et al., 2016) и стрессе высших водных растений в ответ на влияние тяжелых металлов (Srivastava et al., 2006). Согласно приведенному определению, найденный нами окислительный стресс байкальского фитопланктона в период массового развития диатомовых – это неспецифический адаптационный ответ на изменение условий окружающей среды. Однако анализ

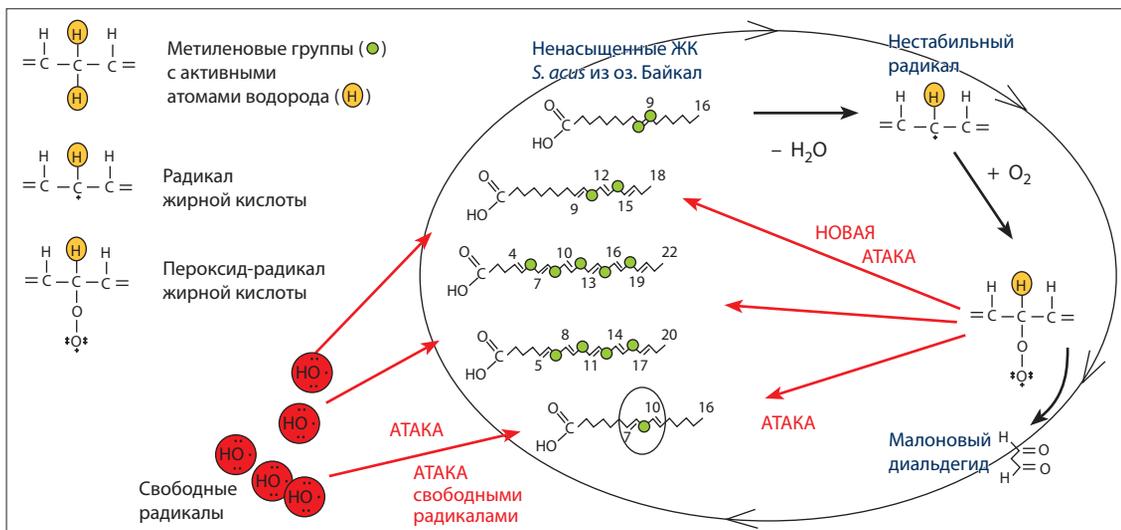


Рис. 4. Свободнорадикальный механизм перекисного окисления основных ненасыщенных кислот байкальского фитопланктона с доминированием *S. acus*.

фитопланктона с доминированием хризофитовых, криптофитовых, динофитовых водорослей показал отсутствие маркеров окислительного стресса. Это связано с тем, что состав их клеточных мембран определяется наличием в них целлюлозы и гемицеллюлозы. Вероятнее всего, благодаря этому мембрана становится более устойчивой и обуславливает лучшую адаптацию данных организмов к действию свободных радикалов.

Отмечена значимая неоднородность результатов определения ППОЛ при отборе проб с одной и той же станции дважды ($n = 2$, стандартное отклонение до 90 %). В силу высокой реакционной способности свободный МДА в биопробах присутствует, как правило, в более низких концентрациях и указывает на процесс перекисного окисления, который идет в клетке в настоящий момент (Zelzer et al., 2013). Неоднородность результатов, скорее всего, связана именно с высокой реакционной способностью МДА. Таким образом, результаты содержания ППОЛ, вероятно, не могут дать точную количественную характеристику стресса. Тем не менее наличие ППОЛ однозначно свидетельствует об исчерпании ресурсов клеточной мембраны диатомей, срыве приспособительных реакций, нарушении гомеостаза и выраженном окислительном стрессе в районах с повышенной антропогенной нагрузкой.

Отсутствие стресса фитопланктона центральных пелагических станций, более низкие количественные характеристики окислительного стресса в пробах фоновых станций и одновременное снижение доли ненасыщенных ЖК в пробах с выраженным окислительным стрессом (см. табл. 3) подтверждают связь стресса *S. acus* с действием чрезвычайных факторов, к которым не выработаны защитные механизмы.

Стресс-факторами, вызывающими перекисное окисление липидов байкальских диатомей, по мнению авторов, являются алкилбензолсульфонаты натрия. Нами показано, что их концентрация в поверхностной прибрежной воде озера достигает критических величин (30 ± 4 мкг/дм³) в районах городов и крупных поселков (по данным анализов 2019–2021 гг.) и в единичном случае оценена значением 54 ± 7 мкг/дм³, хотя для большинства проб не превышает 10.0 ± 1.2 мкг/дм³. Данные соединения среди прочих ПАВ обладают наибольшей токсичностью, оказывают острое и хроническое воздействие на водные организмы при концентрациях ≤ 10 –20 мкг/дм³, включая окислительный стресс (Lewis, 1991; Jorgensen, Christoffersen, 2000), отнесены к классу опасных веществ¹ согласно Программе ООН по окружающей среде и к классу особо опасных² веществ для уникальной экологической системы озера Байкал – объекта мирового природного наследия ЮНЕСКО.

Заключение

Выявлен окислительный стресс прибрежного байкальского фитопланктона с доминированием диатомовых во-

дорослей *Synedra acus* subsp. *radians*, отобранного в районах с повышенной антропогенной нагрузкой. Сделано предположение о том, что диатомовая водоросль *S. acus* является биоиндикатором присутствия в экосистеме ксенобиотиков, вызывающих окислительный стресс. В подледный период окислительный стресс фитопланктона не обнаружен в связи с доминированием водорослей других отделов и их лучшей адаптацией к действию активных форм кислорода. Стресс прибрежного планктона можно объяснить повышенными концентрациями АСПАВ в воде оз. Байкал.

Список литературы / References

- Байкаловедение: в 2 кн. Под ред. О.Т. Русинек. Новосибирск: Наука, 2012. Кн. 2.
[Rusinek O.T. (Ed.) Baikal Research: In 2 volumes. Volume 2. Novosibirsk: Nauka Publ., 2012. (in Russian)]
- Белых О.И., Бессудова А.Ю., Гладких А.С., Кузьмина А.Е., Помазкина Г.В., Поповская Г.И., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Усольцева М.В., Фирсова А.Д., Лихошвай Е.В. Руководство по определению биомассы фитопланктона пелагиали озера Байкал. Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2011.
[Belykh O.I., Bessudova A.Yu., Gladkikh A.S., Kuz'mina A.E., Pomazkina G.V., Popovskaya G.I., Sorokovikova E.G., Tikhonova I.V., Usol'tseva M.V., Firsova A.D., Likhoshvay E.V. Guideline for the measurement of phytoplankton biomass in the pelagic zone of Lake Baikal. Irkutsk, 2011. (in Russian)]
- Вотинцев К.К., Мещерякова А.И., Поповская Г.И. Круговорот органического вещества в озере Байкал. Наука: Новосибирск, 1975.
[Votintsev K.K., Meshcheryakova A.I., Popovskaya G.I. Organic matter cycle in Lake Baikal. Novosibirsk: Nauka Publ., 1975. (in Russian)]
- Глезер С.И., Бондаренко Н.А., Щур Л.А. Диатомовые водоросли озер юга и севера Восточной Сибири. Рыбинск: Рыбин. дом печати, 2011.
[Glezer S.I., Bondarenko N.A., Shchur L.A. Diatoms in lakes of southern and northern East Siberia. Rybinsk: Rybinskiy Dom Pechati Publ., 2011. (in Russian)]
- Ладейщиков Н.П. Изучение климата Байкала. В: Галазий Г.И., Вотинцев К.К. (ред.). Путь познания Байкала. Новосибирск: Наука, 1987;76-84.
[Ladeishchikov N.P. Study of Baikal climate. In: Galazii G.I., Votintsev K.K. (Eds.) The Way of Knowing Baikal. Novosibirsk: Nauka Publ., 1987;76-84. (in Russian)]
- Макарова И.В., Пичкилы Л.О. К некоторым вопросам методики вычисления биомассы фитопланктона. *Ботан. журн.* 1970; 55(10):1788-1794.
[Makarova I.V., Pichkily L.O. Some issues in the calculation of phytoplankton biomass. *Botanicheskiy Zhurnal = Botanical Journal.* 1970;55(10):1788-1794. (in Russian)]
- Матвиенко О.М., Литвиенко Р.М. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. III. Частина 2. Пирофієтці водорості – Ругтофіта. Київ: Наук. думка, 1977.
[Matvienko O.M., Litvienko R.M. Key to sweetwater algae of the Ukrainian Soviet Socialist Republic. III. Part 2. Pyrophyta. Kiev: Naukova Dumka Publ., 1977. (in Ukrainian)]
- Никонова А.А., Шишлянникова С.М., Шишлянникова Т.А., Авезова Т.Н., Бабенко Т.А., Белых О.И., Глызина О.Ю., Оболкин В.А., Павлова О.Н., Смагунова А.Н., Суханова Е.В., Тихонова И.В., Ханаева Т.А., Хуторянский В.А. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в гидробионтах с различным содержанием полиненасыщенных кислот методом газожидкостной хроматографии. *Журн. аналит. химии.* 2020;75(10):907-920. DOI 10.31857/S0044450220100102.
[Nikonova A.A., Shishlyannikov S.M., Shishlyannikova T.A., Avezova T.N., Babenko T.A., Belykh O.I., Glyzina O.Y., Obolkin V.A.,

¹ Linear alkylbenzene sulfonates. SIDS Initial Assessment Report for 20th SIAM. UNEP Publications, Paris, France, 19–21 April, 2005.

² Приказ № 83 от 21.02.2020. Об утверждении нормативов предельно допустимых воздействий на уникальную экологическую систему озера Байкал и перечня вредных веществ, в том числе веществ, относящихся к категориям особо опасных, высокоопасных, опасных и умеренно опасных для уникальной экологической системы озера Байкал. Министерство природных ресурсов и экологии РФ.

- Pavlova O.N., Smagunova A.N., Sukhanova E.V., Tikhonova I.V., Khanaeva T.A., Khutoryansky V.A. Determination of free and esterified fatty acids in hydrocoles of different content of polyunsaturated fatty acids by gas-liquid chromatography. *J. Anal. Chem.* 2020;75:1310-1321. DOI 10.1134/S1061934820100093.]
- Порядин Г.В. Стресс и патология. М.: М-во здравоохранения РФ, 2009.
[Poryadin G.V. Stress and Pathology. Moscow, 2009. (in Russian)]
- Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. Киев: Наук. думка, 1990.
[Tsarenko P.M. Short key to Chlorococcales algae of the Ukrainian Soviet Socialist Republic. Kiev: Naukova Dumka Publ., 1990. (in Russian)]
- Al-Rashed S.A., Ibrahim M.M., El-Gaaly G.A., Al-Shehri S., Mostafa A. Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. *Saudi J. Biol. Sci.* 2016;23(6):706-712. DOI 10.1016/j.sjbs.2016.06.010.
- Bondarenko N.A., Logacheva N.F. Structural changes in phytoplankton of the littoral zone of Lake Baikal. *Hydrobiol. J.* 2017;53(2):16-24. DOI 10.1615/HydrobJ.v53.i2.20.
- Datta A., Marella T.K., Tiwari A., Wani S.P. The Diatoms: from eutrophic indicators to mitigators. In: Gupta S.K., Bux F. (Eds.) Application of Microalgae in Wastewater Treatment. Springer, 2019;19-40. DOI 10.1007/978-3-030-13913-1_2.
- Dixit S.S., Smol J.P., Kingston J.C., Charles D.F. Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environ. Sci. Technol.* 1992; 26(1):22-33. DOI 10.1021/es00025a002.
- Goncalves A.M.M., Marques J.C., Goncalves F. Fatty acids' profiles of aquatic organisms: revealing the impacts of environmental and anthropogenic stressors. In: Catala A. (Ed.) Fatty Acids. London: Intech Open, 2017;89-117. DOI 10.5772/intechopen.68544.
- Hampel M., Ortiz-Delgado J.B., Sarasquete C., Blasco J. Effects of sediment sorbed linear alkylbenzene sulphonate on juveniles of the Senegal sole, *Solea senegalensis*: toxicity and histological indicators. *Histol. Histopathol.* 2008;23(1):87-100. DOI 10.14670/HH-23.87.
- Haraguchi H., Ishikawa H., Kubo I. Antioxidative action of diterpenoids from *Podocarpus nagi*. *Planta Med.* 1997;63(3):213-215. DOI 10.1055/s-2006-957655.
- Jorgensen E., Christoffersen K. Short-term effects of linear alkylbenzene sulfonate on freshwater plankton studied under field conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000;19(4):904-911. DOI 10.1002/etc.5620190417.
- Karthikeyan P., Manimaran K., Sampathkumar P., Jaikumar M., Robin R.S., Saravanakumar C., Sureshkumar C. In vitro antioxidant activity of marine diatoms. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* 2013;5(2):32-37. DOI 10.9790/2402-0523237.
- Lewis A.M. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Resour.* 1991;25(1): 101-113. DOI 10.1016/0043-1354(91)90105-Y.
- Marnett L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 1999;424(1-2):83-95. DOI 10.1016/s0027-5107(99) 00010-x.
- Nakashizuka T., Stork N. (Eds.) Biodiversity Research Methods: YBOY (International Biodiversity Observation Year) in Western Pacific and Asia. Kyoto: Univ. Press; Trans Pacific Press, 2002.
- Nikonova A.A., Shishlyannikov S.M., Volokitina N.A., Galachyants Yu.P., Bukin Yu.S., Blinov V.V., Gnatovsky R.Yu., Vorobyeva S.S. Fatty acid changes in nearshore phytoplankton under anthropogenic impact as a biodiversity risk factor for the world's deepest Lake Baikal. *Diversity.* 2022;14(1):55. DOI 10.3390/d1401 0055.
- Popovskaya G.I., Usoltseva M.V., Domysheva V.M., Sakirko M.V., Blinov V.V., Khodzher T.V. The spring phytoplankton in the pelagic zone of Lake Baikal during 2007–2011. *Geogr. Nat. Resour.* 2015; 36:253-262. DOI 10.1134/S1875372815030051.
- Rakita S.M., Čolović D.S., Levart A.R., Banjac V.V., Čolović R.R., Dragojlović D.M., Duragić O.M. A rapid spectrophotometric method for determination of thiobarbituric acid reactive substances in rainbow trout feed. *Food Feed Res.* 2020;47(1):43-53. DOI 10.5937/ FFR2001043R.
- Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. The Diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990.
- Srivastava S., Tripathi G., Mishra S., Gupta G. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle. *Aquat. Toxicol.* 2006;80(4):405-415. DOI 10.1016/j.aquatox.2006.10.006.
- Starmach K. Chrysophyceae und Haptophyceae. In: Pascher A. (Ed.) Subwasseflora von Mitteleuropa. Bd. 1. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1985.
- Vega-López A., Ayala-López G., Posadas-Espadas B.P., Olivares-Rubio H.F., Dzul-Caamal R. Relations of oxidative stress in freshwater phytoplankton with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbon. *Comp. Biochem. Physiol. Part A. Mol. Integr. Physiol.* 2013;165(4):498-507. DOI 10.1016/j.cbpa.2013.01.026.
- Vorobyeva S.S. Phytoplankton assemblages of the Southern Baikal in 1990–1995 and 2016–2018. *Limnol. Freshw. Biol.* 2018;2:141-143. DOI 10.31951/2658-3518-2018-A-2-141.
- Zelzer S., Oberreither R., Bernecker C., Stelzer I., Truschnig-Wilders M., Fauler G. Measurement of total and free malondialdehyde by gas-chromatography mass spectrometry – comparison with high-performance liquid chromatography methodology. *Free Radic. Res.* 2013;47(8):651-656. DOI 10.3109/10715762.2013.812205.
- Zhou J., Wu Z., Yu D., Pang Y., Cai H., Liu Y. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate to aquatic plant *Potamogeton perfoliatus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018;25(32):32303-32311. DOI 10.1007/s11356-018-3204-7.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность директору ЛИН СО РАН д.г.-м.н. А.П. Федотову, к.г.н. В.А. Оболкину, к.б.н. Л.А. Оболкиной, инж. К.С. Дубровой, д.б.н. проф. Е.В. Лихошвай, к.х.н. доц. А.Г. Горшкову, д.б.н. проф. В.В. Дрюккеру и сотрудникам флота ЛИН СО РАН. Исследование выполнено в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ № 0279-2021-0005 «Исследование трансформации водоемов и водотоков Восточной Сибири в сезонных и долговременных аспектах в контексте изменений климата, геологической среды и антропогенных нагрузок».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.04.2022. После доработки 30.05.2022. Принята к публикации 30.05.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

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

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия
 muratova_a@ibppm.ru

Аннотация. Растительно-микробные ассоциации в результате своей физиолого-биохимической активности способны определять подвижность, биодоступность и накопление в растительных тканях тяжелых металлов. Указанные способности являются основой для использования растений и ассоциированных с ними микроорганизмов в разработке подходов, обеспечивающих как предотвращение попадания токсичных металлов в пищевые культуры, так и извлечение загрязнителей из загрязненных земель с помощью технологий фиторемедиации. Успешное применение растительно-микробных комплексов в той или иной области зависит от изученности механизмов взаимодействий в системе конкретных организмов с тяжелыми металлами. Целью представленных исследований была оценка влияния ионов меди на эффекты бактеризации растений пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) тремя штаммами *Azospirillum*, обладающими свойствами стимуляции роста растений (PGPR). В ходе эксперимента анализировали ростовые параметры 14-суточных проростков пшеницы, содержание пигментов фотосинтеза, активность растительных оксидоредуктаз и аккумуляцию металла растительными тканями. Все штаммы в той или иной степени компенсировали фитотоксическое воздействие меди на развитие проростков и увеличивали ее аккумуляцию в корнях и побегах. Показано отчетливое усиление воздействия меди на фотосинтетический аппарат бактеризованных растений, выражающееся в изменении содержания основных пигментов, в первую очередь уменьшении хлорофилла *b*. Анализ активности растительных оксидоредуктаз (пероксидаз и фенолоксидаз) как участников физиологических ответов растений на стрессовые воздействия выявил их штаммоспецифичный характер и существенное влияние меди на бактеризованные растения. В целом полученные результаты показали отчетливое разноплановое влияние исследованных штаммов азоспирилл на физиолого-биохимический статус растений пшеницы. Выявленный компенсаторный эффект бактерий на фитотоксическое воздействие меди и одновременно повышение ее накопления в растительных тканях могут рассматриваться как взаимоисключающие аспекты растениеводства, связанные с выращиванием пищевых растений на загрязненных тяжелыми металлами площадях.

Ключевые слова: *Azospirillum*; *Triticum aestivum*; медь; проростки; фотосинтетические пигменты; пероксидаза; лакказа; тирозиназа.

Для цитирования: Муратова А.Ю., Любунь Е.В., Голубев С.Н., Турковская О.В. Влияние ионов меди на ассоциации бактерий рода *Azospirillum* с проростками пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):477-485. DOI 10.18699/VJGB-22-58

Effect of copper ions on the associations of *Azospirillum* bacteria with wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)

A.Yu. Muratova , E.V. Lyubun, S.N. Golubev, O.V. Turkovskaya

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Saratov Federal Scientific Centre
of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia
 muratova_a@ibppm.ru

Abstract. The physiological and biochemical activity of plant–microbial associations enables them to determine the mobility, bioavailability, and accumulation of heavy metals in plant tissues. These abilities are the basis for the use of plants and their associated microorganisms in the development of approaches that ensure both the prevention of the ingress of toxic metals into food crops and the extraction of pollutants from polluted soils by using phytoremediation technologies. Whether plant–microbial complexes are used successfully depends on the knowledge of how specific organisms interact with heavy metals. We evaluated the effect of copper ions on common wheat (*Triticum aestivum* L.) inoculated with three plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) of the genus *Azospirillum*. We analyzed the growth variables of 14-day-old wheat seedlings, the content of photosynthesis pigments, the activity of plant oxidoreductases, and the accumulation of copper by plant tissues. All strains more or less compensated for copper toxicity to seedling development and increased metal accumulation in roots and shoots. Copper affected the photosynthetic apparatus of the inoculated plants, primarily by decreasing the content of chlorophyll *b*. An analysis of the activity of plant oxidoreductases (peroxidases and phenoloxidases), which are involved in the physiological responses of plants to pollutant stress, showed strain-specific dependence and a significant effect of copper on the inoculated plants. Overall, the

obtained results clearly show that the effect of *Azospirillum* on the physiological and biochemical status of wheat is diverse. The compensatory effect of bacteria on copper toxicity and the simultaneous increase in metal accumulation in plant tissues can be considered as mutually exclusive crop-production aspects associated with the growing of food plants in heavy-metal-polluted areas.

Key words: *Azospirillum*; *Triticum aestivum*; copper; seedlings; photosynthetic pigments; peroxidase; laccase; tyrosinase.

For citation: Muratova A.Yu., Lyubun E.V., Golubev S.N., Turkovskaya O.V. Effect of copper ions on the associations of *Azospirillum* bacteria with wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):477-485. DOI 10.18699/VJGB-22-58

Введение

Антропогенное загрязнение почв тяжелыми металлами – серьезная экологическая проблема. Накопление в экосистемах этих опасных токсикантов приводит к увеличению их поглощения растениями и миграции по пищевым цепям вплоть до человека (Ларионов М.В., Ларионов Н.В., 2010). Важнейшую роль в превращении, транслокации и аккумуляции тяжелых металлов в природе играют растительно-микробные комплексы. В результате своей физиолого-биохимической активности микроорганизмы и растения способны преобразовывать соединения тяжелых металлов, определяя их подвижность, биодоступность и накопление иногда в значительных количествах (Nadeem et al., 2015). Указанные способности являются основой для использования растительно-микробных ассоциаций, с одной стороны, в разработке подходов, предотвращающих попадание токсичных металлов в пищевые культуры, а с другой – в создании технологий очистки агроландшафтов от загрязнения (фиторемедиации). Успешное применение растительно-микробных комплексов в той или иной области зависит от изученности механизмов взаимодействий в системе конкретных организмов с тяжелыми металлами.

Бактерии рода *Azospirillum* – типичные представители ассоциативной микрофлоры растений, их жизнедеятельность тесно связана с корневой системой преимущественно злаков (Reis et al., 2015). Азоспириллы являются факультативными diaзотрофами, способными к фиксации атмосферного азота в микроаэрофильных условиях, и характеризуются продукцией фитогормонов, таких как ауксины, гиббереллины и цитокинины, а также других фитоактивных веществ, что делает их яркими представителями группы стимулирующих рост растений ризобактерий (plant-growth-promoting rhizobacteria, PGPR) (Bashan, De-Bashan, 2010; Fukami et al., 2018). Для азоспирилл выявлены различия в стратегии колонизации корней растений, что позволило охарактеризовать эпифитные (колонирующие только поверхность корня) и эндофитные (способные проникать во внутренние ткани корня) штаммы (Rothballer et al., 2003). Вступая во взаимодействие с растениями, азоспириллы активно участвуют в стимуляции их роста и способны снижать фитостресс, вызванный экологическими факторами, за счет различных механизмов, в том числе с помощью повышения поглощения и мобилизации минералов (Bashan, De-Bashan, 2010). Одним из типичных растений-ассоциантов для азоспирилл является пшеница. Положительный эффект от инокуляции азоспириллами значимых сельскохозяйственных культур, включая пшеницы, неоднократно описан исследователями (Teixeira Filho et al., 2017; Galindo et al., 2019; Boleta et al., 2020).

Есть данные, согласно которым представители вида *A. brasilense* демонстрируют устойчивость к ряду токсичных тяжелых металлов (Co, Cu, Zn, Cd). При этом отмечаются различия в проявлении толерантности к металлам у эндофитных и эпифитных азоспирилл (Kamnev et al., 2005; Камнев и др., 2007).

В организме растения один из важнейших микроэлементов, участвующих в различных физиологических процессах, таких как транспорт электронов при фотосинтезе, митохондриальное дыхание, ответ на окислительный стресс, гормональный сигналинг, это медь. В качестве кофактора медь входит в состав многих растительных ферментов и белков: супероксиддисмутазу, цитохром *c*-оксидазу, аминоксидазу, лакказу, тирозиназу, полифенолоксидазу, пластоцианин (Yruela, 2005; Pichhode, Nikhil, 2015). Однако медь в высоких концентрациях фитотоксична. Избыточное содержание этого металла вызывает различные повреждения в растениях, в том числе в пшенице (Quartacci et al., 2000; Michaud et al., 2007; Dang et al., 2009). Инокуляция бактериями *A. brasilense* может увеличивать устойчивость пшеницы к стрессу, вызванному присутствием в среде ионов Cu^{2+} (El-Samad, 2017). При этом эффект от инокуляции штаммами, характеризующимися различными стратегиями взаимодействия с растениями, может различаться, что требует дополнительного изучения. На основании ранее проведенных исследований (Камнев и др., 2007), показавших различия между эпифитным и эндофитным штаммами *A. brasilense* в механизмах устойчивости к металлам, связанным с накоплением поли-3-гидроксибутирата как фактора, способствующего выживанию в неблагоприятных условиях, мы предполагаем, что различия могут наблюдаться и во взаимодействии таких штаммов с растениями в условиях стресса, вызванного присутствием в среде тяжелых металлов.

Целью представленных исследований была оценка влияния ионов меди на эффекты бактериализации растений пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) различными штаммами *A. brasilense*, обладающими свойствами стимуляции роста растений.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 (IBPPM 150), *A. brasilense* Cd (IBPPM 288) и *A. baldaniorum* Sp245 (IBPPM 219, ранее отнесенный к виду *A. brasilense* и переописанный dos Santos Ferreira с коллегами (dos Santos Ferreira et al., 2020)) из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>).

Микроорганизмы культивировали в жидкой или агаризованной (1.5 %) среде следующего состава, г/л:

K_2HPO_4 – 0.1; KH_2PO_4 – 0.4; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0.2; $NaCl$ – 0.1; $CaCl_2$ – 0.02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2.0; $NTA-3Na$ – 5.6; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0.002; малат натрия – 3.8; NH_4Cl – 1.0; рН 7.0. Медь вносили в виде сульфата меди в количестве, соответствующем минимальной ингибирующей рост бактерий концентрации, которая составила 0.5 ммоль/л по результатам предварительных исследований.

Семена мягкой яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29 были получены из ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока», г. Саратов. Перед использованием их калибровали, промывали детергентом 10 мин при встряхивании для удаления гидрофобных загрязнений и стерилизовали, обрабатывая сначала 70 % (об./об.) этанолом в течение 3 мин, затем диацидом (1:1000; 666 мг/л хлорида цетилпиридина и 333 мг/л этанола хлорида ртути) 5 мин, затем смесью рифампицина (4 мкг/мл) и амфотерицина Б (20 мкг/мл) при комнатной температуре и встряхивании (120 об/мин) 24 ч и вновь диацидом (1:1000) в течение 2.5 мин. После каждого этапа семена многократно промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена пшеницы помещали по одному в стерильные биологические пробирки (20 × 300 мм), содержащие 15 см³ стеклянных бус диаметром 2 мм (SiLibeads, Sigmund Lindner, Германия) и 6 мл раствора Хогланда для культивирования растений (Hoagland, Arnon, 1950). В среду для выращивания растений добавляли 0.5 ммоль/л Cu^{2+} в виде $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Контроль был представлен чистой средой. Опытные растения бактериализовали внесением микробной суспензии в каждую пробирку.

Для получения биомассы инокулянта микроорганизмы выращивали в жидкой малатной среде в течение 18 ч, клетки из среды осаждали центрифугированием (11 000 g, 5 мин), отмывали и ресуспендировали в стерильной среде. В каждую пробирку с 3-суточным проростком пшеницы вносили по 30 мкл выделенной бактериальной суспензии до получения исходной концентрации инокулянта в среде 10^7 клеток/мл. Небактериализованные растения использовали как контроль. Растения выращивали в фитокамере при 24 °C в течение 14 дней с периодом освещения день/ночь 13/11 ч. Освещение обеспечивали комплектом люминесцентных ламп Fluora (Osram, Германия).

По окончании культивирования анализировали ростовые параметры 14-суточных проростков пшеницы, содержание пигментов фотосинтеза, активность растительных оксидоредуктаз и аккумуляцию металла растительными тканями. Морфологические параметры (длину корня и побега) измеряли калиброванной линейкой из нержавеющей стали. Затем корни и побеги высушивали до постоянной массы и взвешивали.

Биохимические анализы проростков включали измерение содержания фотосинтетических пигментов и оценку ферментной активности корней и побегов. Содержание хлорофиллов *a* и *b* (Хл *a* и Хл *b*) и каротиноидов определяли спектрофотометрически в этанольных экстрактах листьев, как описано ранее (Lyubun et al., 2020).

Для определения активности растительных оксидоредуктаз (пероксидазы, лакказы и тирозиназы) навески побегов и корней (0.2–0.3 г) растирали в ступке с кварцевым песком и ресуспендировали в 2 мл 0.2 М Na/K-фосфатного буфера, рН 6.0. Гомогенат центрифугировали при 5000 g

в течение 10 мин, осадок дополнительно отмывали фосфатным буфером и повторно центрифугировали. В полученных супернатантах определяли активность ферментов и содержание белка с помощью спектрометра Evolution 60 (Thermo Scientific, США). Содержание белка находили методом Брэдфорд (Bradford, 1976).

Активность пероксидаз (КФ 1.11.1.7) измеряли с использованием 23 мкМ 2,7-диаминофлуорена (ДАФ) в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 600 нм (Criquet et al., 2000); 1 мМ 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония (АБТС) в 0.05 М Na-тарtratном буфере, рН 3.5, при 436 нм (Yang et al., 2007); 0.3 мМ *o*-дианизида (ДАЗ) в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 460 нм в присутствии 0.5 мМ H_2O_2 . Активность лакказы (КФ 1.10.3.2) устанавливали по образованию продуктов окисления 7.5 мкМ сиригальдазина (СГЗ) в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 525 нм (Leonowicz, 1981) и 23 мкМ ДАФ в 0.05 М Na/K-фосфатном буфере, рН 6.0, при 600 нм (Criquet et al., 2000). Активность тирозиназы (КФ 1.10.3.3) определяли в 4 мМ растворе 3,4-дигидроксифенил-L-аланина (ДОФА) в 50 мМ трис-HCl буфере, рН 7.5, при 475 нм (Criquet et al., 2000). Активность ферментов выражали в микромолях окисленного субстрата в минуту на 1 мг белка.

Общее количество меди в растениях анализировали с помощью системы атомно-абсорбционной спектроскопии с графитовой печью (Thermo Scientific iCE 3500 Solaar). В тефлоновые контейнеры с 200 мг высушенного до постоянной массы растительного материала добавляли 3 мл HNO_3 (Suprapur, Merck, Германия) и 2 мл H_2O_2 (30 %, чда; JT Baker Chemical Co., США). Затем образцы обрабатывали в микроволновой печи SEM MARS Xpress (Matthews, США) с помощью оптимизированной программы для сжигания растительного материала. После обработки объем образцов доводили до 20 мл ультрачистой деионизированной водой и анализировали на содержание металлов на спектрометре.

Все эксперименты и анализы проводили не менее чем в трехкратной повторности, в каждой повторности использовали от 5 до 8 растений. Для полученных данных вычисляли средние значения, которые сравнивали, применяя *t*-критерий ($p \leq 0.05$). Корреляционный анализ выполняли с использованием ранговых корреляций Спирмена. Обработку и анализ данных осуществляли в программе Excel 2007 (Microsoft Office, США) и пакете Statistica 13.0 (TIBCO Software Inc. 2017, Statsoft Russia).

Результаты

Рост и развитие растений

Присутствие в среде ионов меди оказывало значительный токсический эффект на развитие проростков пшеницы сорта Саратовская 29, что выражалось в уменьшении как длины, так и массы корней и побегов. При этом ингибирование корневой системы было более выраженным (длина корней уменьшилась на 58 %, масса – на 13 %), тогда как сокращение длины побегов составило лишь 8 %, а их масса достоверно не изменилась (табл. 1).

Эффект бактериализации на развитие проростков пшеницы в течение 14 сут в чистых условиях был различным

Таблица 1. Показатели длины и массы проростков пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	Корни		Побеги	
	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺
Длина, см				
Без бактерий	18.8±2.2	7.8±0.9 [#]	38.3±4.5	35.3±6.2
Sp245	14.9±3.7*	14.7±1.7*	31.5±7.9	37.5±6.9
Cd	20.9±1.6	13.7±3.9 ^{#*}	41.2±1.7	35.2±5.2 [#]
Sp7	18.2±3.6	18.6±1.9*	36.0±4.9	39.1±6.1
Масса, мг				
Без бактерий	117.0±14.2	101.3±6.6 [#]	227.4±15.7	237.9±15.9
Sp245	142.4±13.6*	132.1±11.7*	242.6±27.1	270.2±26.7 ^{#*}
Cd	178.1±16.6*	163.7±23.4*	347.3±21.2*	285.5±23.2 ^{#*}
Sp7	127.5±13.4	169.8±11.4 ^{#*}	263.4±24.5*	257.1±16.2*

Примечание. Приведены средние значения ($n \geq 6$) ± стандартное отклонение. Здесь и в табл. 2–4: * значения достоверно отличаются от небактеризованного контроля, $p \leq 0.05$; # значения достоверно отличаются от варианта без Cu²⁺; $p \leq 0.05$.

Таблица 2. Содержание фотосинтетических пигментов в проростках пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	Хл a	Хл b	Хл a+b	Хл a/Хл b	Каротиноиды, мг/г
	мг/г				
Без Cu ²⁺					
Без бактерий	0.99±0.05	0.76±0.05	1.75±0.11	1.31±0.14	0.35±0.04
Sp245	1.10±0.03*	0.82±0.03*	1.91±0.09*	1.34±0.14	0.38±0.29
Cd	1.08±0.12	0.80±0.02	1.88±0.15	1.34±0.12	0.38±0.19
Sp7	1.11±0.09*	0.82±0.11	1.92±0.12*	1.33±0.15	0.38±0.21
Cu ²⁺					
Без бактерий	1.09±0.11	0.87±0.08 [#]	1.96±0.22	1.24±0.32	0.36±0.03
Sp245	1.00±0.03 [#]	0.50±0.04 ^{#*}	1.50±0.12 ^{#*}	2.00±0.51 ^{#*}	0.19±0.06*
Cd	0.88±0.02 ^{#*}	0.34±0.02 ^{#*}	1.22±0.05 ^{#*}	2.55±0.12 ^{#*}	0.15±0.09 ^{#*}
Sp7	1.06±0.04	0.53±0.06 ^{#*}	1.60±0.12 ^{#*}	1.99±0.11 ^{#*}	0.20±0.02*

Примечание. Приведены средние значения ($n \geq 6$) ± стандартное отклонение.

и зависел от используемого штамма (см. табл. 1). *Azospirillum brasilense* Sp7 оказывал достоверное воздействие только на массу побегов, увеличивая ее относительно небактеризованного контроля на 16 %. *Azospirillum baldaniorum* Sp245 достоверно уменьшал длину корней (на 20 %), существенно увеличивая их массу (на 22 %). Штамм *A. brasilense* Cd оказывал наибольшее воздействие на проростки, достоверно повышая массу корней и побегов – на 52 и 53 % соответственно.

Присутствие меди по-разному влияло на эффект бактериализации в отношении как длины корней и побегов, так и их массы. У растений, бактеризованных штаммом Cd, наблюдалась тенденция к снижению биомассы корней, их длина уменьшалась на 34 %, а длина и масса побегов уменьшались на 14 и 18 % соответственно. Влияние меди на длину корней и побегов растений, бактеризованных штаммами Sp245 и Sp7, не было достоверным. При этом штамм Sp245 снижал биомассу корней, но увеличивал на 11 % биомассу побегов, а штамм Sp7, напротив, уве-

личивал на 33 % биомассу корней и слегка снижал массу побегов.

Следует также отметить, что бактеризация в случае всех штаммов уменьшала токсическое влияние меди на проростки, что наиболее отчетливо выражалось по увеличению таких показателей, как длина корней (в 1.7–2.4 раза) и их масса (на 30–68 %). Полное нивелирование негативного влияния меди на длину корня достигалось только в случае штамма Sp7, тогда как инокуляция всеми штаммами не только компенсировала воздействие меди по показателю массы корней, но и существенно повышала его относительно небактеризованного контроля в чистых условиях.

Содержание пигментов фотосинтеза

Присутствие меди в случае небактеризованных проростков пшеницы не оказывало выраженного воздействия на содержание и соотношение фотосинтетических пигментов (табл. 2).

Бактеризация растений, культивируемых в чистой среде, способствовала увеличению содержания хлорофиллов *a* и *b* и их суммы на 11, 8 и 9 % соответственно для штамма Sp245 и на 12, 8 и 10 % соответственно для штамма Sp7, но соотношение этих пигментов и содержание каротиноидов в данных вариантах опыта менялись незначительно.

Влияние меди на эффекты бактериализации для штаммов Sp245, Cd и Sp7 выразилось в значительном снижении содержания хлорофилла *b* (на 43, 58 и 39 % соответственно), суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* (на 23, 38 и 18 %), каротиноидов (на 47, 58 и 44 %) и в увеличении соотношения хлорофиллов *a* и *b* (на 61, 105 и 60 % соответственно).

Аккумуляция меди в тканях проростков

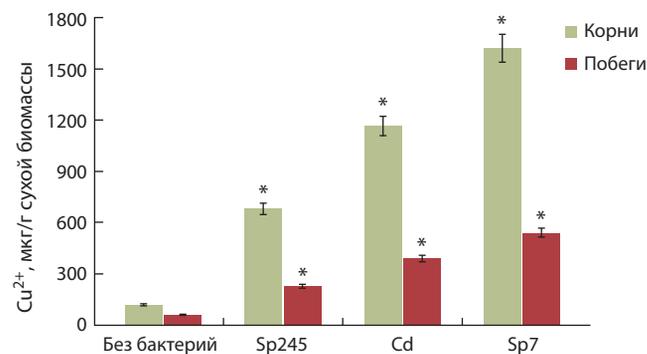
В нашем исследовании содержание ионов меди в тканях пшеницы, выращенной в чистой среде, варьировало от 17 до 28 мкг/г сухой биомассы. Содержание ионов Cu^{2+} в растениях, выращенных в присутствии меди в концентрации 0.5 ммоль/л, представлено на рисунке.

В небактеризованных проростках накопление металла в корнях и побегах составило 116 и 59 мкг/г соответственно. Бактеризация приводила к значительному увеличению этих показателей. При обработке штаммами Sp245, Cd и Sp7 накопление меди корнями растений увеличивалось в 6, 10 и 14 раз, а побегами – в 4, 7 и 9 раз соответственно.

Активность окислительных ферментов пшеницы

Активность общей пероксидазы растений пшеницы определяли с использованием ряда субстратов, которые позволяли учитывать разные изоформы этого фермента. В целом, согласно полученным данным (табл. 3), активность пероксидазы в корнях была значительно выше, чем в побегах растений.

Присутствие в среде культивирования Cu^{2+} в исследуемой концентрации не вызывало значительного изменения активности пероксидазы в корнях, но в побегах наблюдалась тенденция к ее снижению.



Содержание меди в сухой биомассе проростков пшеницы сорта Саратовская 29, выращенных в присутствии металла и различных штаммов азоспирилл.

* значения достоверно отличаются от небактеризованного контроля, $p \leq 0.05$.

Инокуляция проростков штаммами Sp245 и Cd вызывала увеличение ДАЗ- и АБТС-пероксидазной активности более чем в 1.5 и 5 раз соответственно в корнях, но не в побегах. Иной ферментативный ответ растения на бактериализацию наблюдался в случае штамма Sp7: активность ДАЗ- и АБТС-пероксидаз в корнях значимо не изменялась, а в побегах увеличивалась в 7.0, 5.8 и 7.5 раза для ДАЗ, АБТС и ДАФ соответственно. Под влиянием бактериализации штаммами Cd и Sp7 отмечалось снижение активности ДАФ-пероксидазы в корнях растений.

Присутствие Cu^{2+} вызывало резкое увеличение активности пероксидазы в корнях пшеницы, инокулированной штаммом Sp7, – в 6.3, 5.7 и 7 раз для ДАЗ, АБТС и ДАФ соответственно, и менее выраженное увеличение в побегах – в 1.6, 1.6 и 2.5 раза. Следует отметить, что наличие Cu^{2+} при бактериализации штаммами Cd и Sp245 повышало пероксидазную активность в побегах пшеницы в 2–3 раза.

Результаты определения активности растительных медьсодержащих фенолоксидаз – лакказы и тирозиназы – представлены в табл. 4. Показано, что добавление в среду Cu^{2+} повышало лакказную активность в корнях

Таблица 3. Активность пероксидаз (Ед./мг белка) в проростках пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	ДАЗ		АБТС		ДАФ	
	Без Cu^{2+}	Cu^{2+}	Без Cu^{2+}	Cu^{2+}	Без Cu^{2+}	Cu^{2+}
Корни						
Без бактерий	66.1 ± 6.5	65.5 ± 12.8	21.8 ± 9.5	24.4 ± 9.1	59.0 ± 6.3	55.2 ± 21.3
Sp245	96.3 ± 11.2*	41.4 ± 10.0*#	33.1 ± 8.2*	15.9 ± 4.2#	72.7 ± 10.5*	28.5 ± 11.1*#
Cd	359.0 ± 93.4*	75.4 ± 8.3#	111.4 ± 13.2*	25.7 ± 11.4#	37.3 ± 18.5*	53.9 ± 17.3
Sp7	71.6 ± 6.7	412.1 ± 23.8*#	20.3 ± 6.1	139.9 ± 14.1*#	45.7 ± 11.3*	388.6 ± 43.7*#
Побеги						
Без бактерий	15.6 ± 5.8	11.4 ± 2.7	4.2 ± 0.6	2.9 ± 0.8#	9.1 ± 2.3	5.9 ± 2.6#
Sp245	17.2 ± 8.1	30.3 ± 12.1*#	4.3 ± 1.1	5.2 ± 2.7*	10.9 ± 3.8	18.6 ± 7.1*#
Cd	15.7 ± 6.5	23.6 ± 7.1*#	4.3 ± 1.7	5.8 ± 1.3*	9.9 ± 2.6	15.8 ± 3.4*#
Sp7	109.9 ± 31.0*	18.5 ± 4.3*#	24.5 ± 6.2*	4.7 ± 1.5*#	68.3 ± 15.0*	14.7 ± 5.1*#

Примечание. Тестовые субстраты: ДАЗ – о-дианизидин; АБТС – 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония; ДАФ – 2,7-диаминофлуорен.

Таблица 4. Активность медьсодержащих фенолоксидаз (Ед./мг белка) в проростках пшеницы сорта Саратовская 29 при культивировании в присутствии меди и различных штаммов азоспирилл

Вариант опыта	Лакказа		СГЗ		Тирозиназа	
	ДАФ		ДОФА			
	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺	Без Cu ²⁺	Cu ²⁺
	Корни					
Без бактерий	1.7±0.4	2.5±0.8	2.1±0.6	2.4±0.7	4.5±1.7	7.6±2.4 [#]
Sp245	2.6±0.8*	1.4±0.7 [#]	3.2±0.9*	2.4±0.4 [#]	6.9±2.1*	4.0±1.5 [#]
Cd	10.4±2.3*	3.5±1.8*	9.6±1.4*	2.4±0.8 [#]	25.2±3.5*	7.6±1.6 [#]
Sp7	1.7±0.1	11.2±2.4** [#]	2.3±0.5	16.1±4.2** [#]	4.0±1.1	28.6±2.2** [#]
	Побеги					
Без бактерий	0.4±0.1	0.4±0.1	0.7±0.2	0.4±0.3	1.1±0.1	0.6±0.1 [#]
Sp245	0.5±0.0*	0.5±0.0*	0.7±0.3	0.5±0.0*	1.2±0.1	1.5±0.7** [#]
Cd	0.5±0.1	0.9±0.2*	0.7±0.2	0.5±0.1	1.1±0.1	1.6±0.2** [#]
Sp7	2.5±0.6*	2.7±1.0*	5.3±1.3*	2.5±0.2*	7.4±1.3*	1.5±0.0** [#]

Примечание. ДАФ – 2,7-диаминофлуорен; СГЗ – сирингальдазин; ДОФА – 3,4-дигидроксифенил-L-аланин.

небактеризованных растений в 1.5 раза (в тесте с ДАФ), а в побегах, наоборот, понижало в 1.75 раза (с СГЗ).

Бактеризация более существенно меняла этот показатель в зависимости от штамма-инокулянта. Наиболее значительное повышение лакказной активности в корнях вызывал штамм Cd – в 6 раз (в тесте с ДАФ), а в побегах – штамм Sp7 – в 7.5 раза (с СГЗ). Присутствие меди снижало эффект бактеризации: в случае штаммов Sp245 и Cd лакказная активность корней была сопоставима с небактеризованными растениями (с СГЗ). Напротив, штамм Sp7 повышал этот показатель почти в 7 раз. Лакказная активность в побегах бактеризованных растений менялась в присутствии меди разнопланово в зависимости от штамма и тестового субстрата, наиболее заметно повышаясь в случае Cd (с ДАФ) – в 1.8 раза, и понижаясь в случае Sp7 (с СГЗ) – в 2 раза.

Аналогично с лакказой, активность тирозиназы в присутствии меди повышалась в корнях и понижалась в побегах (в 1.7 раза). В отсутствие меди штаммы Sp245 и Cd стимулировали тирозиназную активность в корнях (в 1.5 и 5.6 раза), но не в побегах пшеницы, тогда как бактеризация штаммом Sp7, напротив, стимулировала тирозиназу побегов (в 6.7 раза), но не корней растений. Добавление меди снижало эффект бактеризации штаммами Sp245 и Cd по активности тирозиназы в корнях в 1.7 и 3.3 раза, несколько повышая ее в побегах. В случае штамма Sp7 активность тирозиназы в присутствии меди увеличилась в 7 раз в корнях и снизилась в 5 раз в побегах.

Обсуждение

Несмотря на то что медь является эссенциальным микроэлементом, ее избыток в среде негативно влияет на растения, что выражается в угнетении их роста и нарушении метаболизма (Yruela, 2005; Michaud et al., 2007; Wang H. et al., 2011; Pichhode, Nikhil, 2015). Учитывая широкую вовлеченность этого элемента в различные физиологические процессы (фотосинтез, дыхание, антиоксидантный ответ, гормональный сигналинг), нарушение баланса меди может приводить к множественным повреждениям в рас-

тении. Механизм токсического действия меди связан с ее способностью прочно связываться с атомами кислорода, азота, серы, что в условиях избыточного содержания приводит к образованию дополнительных связей и/или замещению медью других металлов в структуре различных биомолекул, включая активные центры многих ферментов (Yruela, 2005; Wang H. et al., 2011). Фитотоксический эффект меди проявляется торможением роста, признаками хлороза и сопровождается развитием окислительного стресса у растений. При этом поглощение и содержание меди в растениях зависят от ряда факторов, в том числе от сортовых особенностей (Медведев, Деревягин, 2017).

В представленной работе все эксперименты проводили с одним сортом мягкой яровой пшеницы. Это означает, что эффекты бактеризации и воздействия меди, обнаруженные нами для сорта Саратовская 29, могут не проявиться на других сортах пшеницы, что требует дальнейших аналогичных исследований с использованием различных генотипов этого растения.

В данном исследовании токсический эффект меди в концентрации 0.05 ммоль/л на проростки пшеницы проявлялся главным образом на корневой системе, непосредственно контактирующей с токсикантом. Об уменьшении длины и массы корней пшеницы, выращенной в гидропонной культуре в присутствии 0.05 ммоль/л меди, сообщалось также в работе (Wang H. et al., 2011). Авторы наблюдали сокращение длины побегов растений, тенденция к чему имела место и в нашем исследовании. Вместе с тем важно подчеркнуть, что используемая концентрация меди не оказывала заметного воздействия на фотосинтетический аппарат пшеницы. Об этом свидетельствует отсутствие значимых изменений содержания хлорофиллов и каротиноидов в листьях растений под влиянием этого металла (см. табл. 2). Следовательно, выявленное токсическое воздействие меди на корневую систему пшеницы осуществлялось без нарушения процесса фотосинтеза.

Нормальная физиологическая концентрация меди в растениях составляет от 3 до 30 мг/кг (Wang H. et al., 2011). Пшеница способна аккумулировать медь из почвы, при-

чем накопление металла в корнях больше, чем в наземной биомассе (Sayyad et al., 2009). Повышенное содержание металлов – нежелательное свойство пищевых злаков. Возможность отбора сортов, наименее склонных к накоплению токсичных элементов, рассмотрена в исследовании генетических механизмов аккумуляции в растениях различных металлов на примере Cu^{2+} и Zn^{2+} с использованием 246 сортов пшеницы (Liu et al., 2021). Среди факторов, влияющих на поглощение металлов растениями из почвы, наряду с многочисленными органическими и неорганическими соединениями, выделяемыми корнями и присутствующими в почвенном растворе, следует выделить деятельность микроорганизмов (Wang S. et al., 2017). Микробы продуцируют внеклеточные полимерные соединения, которые могут адсорбировать или хелатировать ионы металлов (Янева, 2009), что может приводить как к осаждению их в среде, так и к увеличению поглощения корнями (Wang S. et al., 2017).

Согласно нашим результатам, инокуляция пшеницы штаммами *A. brasilense* способствовала аккумуляции меди в тканях растения. Степень влияния инокулянтов ($\text{Sp7} > \text{Cd} > \text{Sp245}$) на вышеуказанный параметр, вероятно, связана с их различиями в стратегии колонизации корней. Штамм *Sp245* охарактеризован как эндофитный, а *Sp7* – как эпифитный (Rothballer et al., 2003). Сведения о штамме *Cd* противоречивы: одни исследователи не выявили способность у этого микроорганизма проникать в корни пшеницы (de Oliveira Pinheiro et al., 2002), тогда как другие обнаруживали клетки штамма в тканях корней томатов (Caiola et al., 2004).

В нашем исследовании инокуляция растений штаммами *A. brasilense* усиливала рост пшеницы, что проявлялось главным образом в увеличении длины и массы корней и побегов. При этом рост-стимулирующий эффект различался между используемыми штаммами. Эндофитный штамм *Sp245* ингибировал рост корней в отсутствие загрязнителя, но компенсировал ингибирующий эффект меди в ее присутствии. Штамм *Cd* оказывал максимальный рост-стимулирующий эффект на длину и массу проростков, выращенных как в присутствии меди, так и без нее.

Накопление меди в тканях пшеницы, в свою очередь, привело к развитию фитотоксических реакций: у всех бактериализованных растений наблюдалось резкое снижение (вдвое) содержания хлорофилла *b* и каротиноидов (см. табл. 2), что не могло не вызвать нарушений в работе фотосинтетического аппарата. Известно, что в высоких концентрациях медь способна подавлять процесс фотосинтеза, нарушая архитектуру мембран тилакоидов, изменяя общую ультраструктуру хлоропластов и ингибируя накопление хлорофилла и фотосинтетический транспорт электронов как ФС I, так и ФС II (Rai et al., 2016). Токсическое воздействие меди на фотосинтетический аппарат может быть связано с ингибированием активности ферментов биосинтеза, а также вытеснением Mg^{2+} из молекулы хлорофилла (Prasad M.N.V., Strzalka, 1999; Rai et al., 2016). При снижении содержания основного фотосинтетического пигмента хлорофилла *a*, которое наблюдалось в случае инокуляции пшеницы штаммом *Cd*, могла происходить конверсия вспомогательного хлорофилла *b* в хлорофилл *a*. Тем самым концентрация хлорофилла *b*

снижалась сильнее, чем концентрация хлорофилла *a* (Breckle, 1991; Prasad D.D.K., Prasad A.R.K., 1987), что и привело к увеличению соотношения хлорофиллов *a/b*. В случае со штаммами *Sp245* и *Sp7*, которые не влияли на содержание хлорофилла *a* в листьях инокулируемой ими пшеницы в присутствии меди, вышеуказанный показатель мог повышаться из-за фотохимического окисления светособирающих комплексов, связывающих хлорофилл *b* (Huang et al., 2004).

Экологический стресс, обусловленный действием как биотических, так и абиотических факторов, как правило, приводит к образованию и накоплению в растительных клетках активных форм кислорода, которые оказывают сильное повреждающее воздействие, препятствующее росту и урожайности растений. Известно, что тяжелые металлы могут служить индуктором растительного окислительного стресса, механизмы и ответные реакции на который неоднократно описаны (Титов и др., 2014). Кроме того, существует множество свидетельств способности бактерий вызывать окислительный стресс (Rais et al., 2017). В ответ на окислительный взрыв в растении активируются различные формы антиоксидантов, среди которых важную роль играют ферменты антиоксидантной защиты. Активизация этих ферментов при стрессе, обусловленном тяжелыми металлами, подробно описана в работе (Титов и др., 2014). При стрессе, спровоцированном микробной инфекцией, предполагают, что активация антиоксидантных ферментов происходит в ответ на распознавание иммунной системой микробных молекулярных паттернов, на некоторые вторичные метаболиты микроорганизмов, на измененный под действием микробных сидерофоров статус железа в растениях (Rais et al., 2017). Изменение активности антиоксидантных ферментов у пшеницы в ответ на различные стресс-факторы обобщено в работе (Caverzan et al., 2016).

В настоящем исследовании предпринята попытка показать, как штаммы азоспирилл, имеющие различные стратегии колонизации корневой системы пшеницы, в присутствии меди могут влиять на активность пероксидазы, которая благодаря своим специфическим свойствам и многочисленному разнообразию молекулярных форм представляет собой одну из ключевых защитных систем клетки при действии на растение любых стресс-факторов (Стаценко и др., 2008). Нами установлено, что активность пероксидазы в корнях проростков пшеницы была значительно выше, чем в побегах. В исследуемой концентрации медь не влияла на активность пероксидазы в корнях и лишь немного снижала ее в побегах небактериализованных растений. В свою очередь бактериализация существенно изменяла активность этого фермента как в отсутствие тяжелого металла, так и в его присутствии. Эффект бактериализации был штаммоспецифичен. У растений, выращенных без меди, пероксидазная активность значительно увеличивалась под влиянием штаммов *Sp245* и *Cd* в корнях, а под влиянием штамма *Sp7* – в побегах. В присутствии меди, напротив, штамм *Sp7* вызывал выраженную индукцию пероксидазы в корнях проростков и в меньшей степени в побегах, тогда как штаммы *Sp245* и *Cd* стимулировали пероксидазную активность преимущественно в побегах. Таким образом, бактериализация

вызывала выраженный антиоксидантный стресс-ответ в растениях пшеницы, в котором, вероятно, участвовали различные изоформы пероксидазы. Увеличение поглощения меди растениями под влиянием микроорганизмов дополнительно стимулировало активность пероксидазы, демонстрируя потенцированное действие абиотического и биотического стресс-факторов.

Помимо пероксидаз, важную роль в защитных реакциях растений играют фенолоксидазы – ферменты, почти повсеместно присутствующие в растениях и часто индуцирующиеся при стрессовых условиях, вызванных повреждением растений или атакой патогена (Sullivan, 2015). По данным (Yang et al., 2007), в ответ на биотический и абиотический стресс в растениях происходит активация синтеза лигнина, в котором участвуют фенолоксидазы и пероксидаза. Согласно нашим результатам, на активность этих ферментов оказывал влияние не столько стресс, вызванный присутствием меди в среде культивирования, сколько бактериализация растений. Бактериализация способствовала увеличению концентрации меди в тканях растений, что, как правило, стимулировало активность исследуемых фенолоксидаз и как медь-зависимых, и как стресс-ферментов.

Поиск корреляционных зависимостей между вариантами обработки растений и анализируемыми параметрами показал достоверную тесную корреляцию между изменением активности исследованных ферментов и бактериализацией растений азоспириллами ($r_s = 0.76$, $p < 0.05$). Примечательно, что из изученных штаммов повышал влияние на ферментативную активность корней в присутствии меди только эпифитный штамм *A. brasilense* Sp7.

Все исследованные штаммы способствовали поглощению меди растениями. При этом следует подчеркнуть различия в наблюдаемых эффектах, вызванных разными штаммами. Так, в отсутствие меди эндофитный штамм *A. baldaniorum* Sp245 уменьшал длину, но увеличивал массу корней проростков, в наименьшей степени способствовал поглощению меди и вызывал наименьшую индукцию антиоксидантных ферментов и фенолоксидаз. Бактериализация растений эпифитным штаммом *A. brasilense* Sp7 в отсутствие металла вызывала максимальную активность пероксидаз и оксидаз в побегах растений, а в присутствии металла в наибольшей степени способствовала поглощению меди и максимальной активизации пероксидаз и оксидаз в корнях. Занимающий промежуточное положение штамм *A. brasilense* Cd характеризовался максимальным рост-стимулирующим эффектом по отношению к пшенице: в отсутствие металла вызывал максимальную активность пероксидаз и оксидаз в корнях, а в присутствии меди оказывал максимальный ингибирующий эффект на фотосинтетический аппарат растения.

Заключение

В целом полученные результаты показали отчетливое разноплановое влияние различных штаммов азоспирилл на физиолого-биохимический статус растений пшеницы. Выявленный компенсаторный эффект исследуемых бактерий на фитотоксическое воздействие меди и одновременно повышение ее накопления в растительных тканях могут рассматриваться как взаимоисключающие аспекты

проблемы растениеводства, связанной с выращиванием пищевых растений на загрязненных тяжелыми металлами площадях.

Список литературы / References

- Камнев А.А., Тугарова А.В., Антонюк Л.П. Эндофитный и эпифитный штаммы *Azospirillum brasilense* по-разному отвечают на стресс, вызываемый тяжелыми металлами. *Микробиология*. 2007;76(6):908-911.
- [Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P. Endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasilense* respond differently to heavy metal stress. *Microbiology*. 2007;76(6):809-811. DOI 10.1134/S0026261707060239.]
- Ларионов М.В., Ларионов Н.В. Особенности накопления тяжелых металлов в почвенных экосистемах Саратовского Поволжья. *Вестн. Оренб. гос. ун-та*. 2010;1(107):110-114.
- [Larionov M.V., Larionov N.V. Characteristics of accumulation of heavy metals in soil ecosystems of Saratov Volga river region. *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2010;1(107):110-114. (in Russian)]
- Медведев И.Ф., Деревягин С.С. Тяжелые металлы в экосистемах. Саратов: Ракурс, 2017.
- [Medvedev I.F., Derevyagin S.S. Heavy Metals in Ecosystems. Saratov: Rakurs Publ., 2017. (in Russian)]
- Стаценко А.П., Тужилова Л.И., Вьюговский А.А. Растительные пероксидазы – маркеры химического загрязнения природных сред. *Вестн. Оренб. гос. ун-та*. 2008;10(92):188-191.
- [Statsenko A.P., Tuzhilova L.I., Vyugovsky A.A. Plant peroxidases – markers of chemical pollution of natural environments. *Vestnik Orenburgskogo Gosudarstvennogo Universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2008;10(92):188-191. (in Russian)]
- Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В. Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: КНЦ РАН, 2014.
- [Titov A.F., Kaznina N.M., Talanova V.V. Heavy Metals and Plants. Petrozavodsk: Karelian Research Centre of RAS, 2014. (in Russian)]
- Янева О.Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов. *Микробиол. журн*. 2009;71(6):54-65.
- [Yaneva O.D. Mechanisms of bacterial resistance to heavy metal ions. *Mikrobiologichnyi Zhurnal = Microbiological Journal*. 2009; 71(6):54-65. (in Ukrainian)]
- Bashan Y., de-Bashan L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment. *Adv. Agron*. 2010;108:77-136. DOI 10.1016/S0065-2113(10)08002-8.
- Boleta E.H.M., Shitate Galindo F., Jalal A., Santini J.M.K., Rodrigues W.L., Lima B.H.D., Arf O., da Silva M.R., Buzetti S., Teixeira Filho M.C.M. Inoculation with growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and its effects on productivity and nutritional accumulation of wheat cultivars. *Front. Sustain. Food Syst*. 2020;4:607262. DOI 10.3389/fsufs.2020.607262.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72(1-2):248-254. DOI 10.1006/abio.1976.9999.
- Breckle S.W. Growth under stress: heavy metals. In: Waisel Y., Kafkafi U. (Eds.) *Plant Roots: The Hidden Half*. N.Y.: Marsel Dekker Inc., 1991;351-373.
- Caiola M.G., Canini A., Botta A.L., Del Gallo M. Localization of *Azospirillum brasilense* Cd in inoculated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Ann. Microbiol*. 2004;54(4):365-380.
- Caverzan A., Casassola A., Brammer S.P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genet. Mol. Biol*. 2016;39(1):1-6. DOI 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0109.
- Criquet S., Joner E., Leglize P., Leyval C. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnol. Lett*. 2000;22:1733-1737. DOI 10.1023/A:1005604719909.

- Dang V.B.H., Doan H.D., Dang-Vu T., Lohi A. Equilibrium and kinetics of biosorption of cadmium (II) and copper (II) ions by wheat straw. *Biores. Technol.* 2009;100(1):211-219. DOI 10.1080/19443994.2012.691745.
- de Oliveira Pinheiro R., Boddey L.H., James E.K., Sprent J., Boddey R. Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. *Plant Soil.* 2002;246(2):151-166. DOI 10.1023/A:1020645203084.
- Dos Santos F.N., Hayashi Sant' A.F., Massena R.V., Ambrosini A., Gazolla V.C., Rothballer M., Schwab S., Baura V.A., Balsanelli E., Pedrosa F.O., Pereira P.L.M., de Souza E.M., Hartmann A., Casan F., Zilli J.E. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70:6203-6212. DOI 10.1099/ijsem.0.004517.
- El-Samad A.H.M. The biphasic role of copper and counteraction with *Azospirillum brasilense* application on growth, metabolites, osmotic pressure and mineral of wheat plant. *Am. J. Plant Sci.* 2017;8: 1182-1195. DOI 10.4236/AJPS.2017.85078.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express.* 2018;8(1):73. DOI 10.1186/s13568-018-0608-1.
- Galindo F.S., Rodrigues W.L., Biagini A.L.C., Fernandes G.C., Barattella E.B., da Silva C.A., Jr, Buzetti S., Teixeira Filho M.C.M. Assessing forms of application of *Azospirillum brasilense* associated with silicon use on wheat. *Agronomy.* 2019;9(11):678. DOI 10.3390/agronomy9110678.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. Berkeley: Univ. of California, 1950;347:8.
- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environ. Pollut.* 2004;130(3):453-463. DOI 10.1016/j.envpol.2003.12.018.
- Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Gardiner P.H.E. Effects of heavy metals on plant-associated rhizobacteria: comparison of endophytic and non-endophytic strains of *Azospirillum brasilense*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2005; 19(1):91-95. DOI 10.1016/j.jtemb.2005.03.002.
- Leonowicz A., Grzywnowicz K. Quantitative estimation of laccase forms in somewhite-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 1981;3:55-58. DOI 10.1016/0141-0229(81)90036-3.
- Liu Y., Chen Y., Yang Y., Zhang Q., Fu B., Cai J., Guo W., Shi L., Wu J., Chen Y. A thorough screening based on QTLs controlling zinc and copper accumulation in the grain of different wheat genotypes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021;28:15043-15054. DOI 10.1007/s11356-020-11690-3.
- Lyubun Y., Muratova A., Dubrovskaya E., Sungurtseva I., Turkovskaya O. Combined effects of cadmium and oil sludge on sorghum: growth, physiology, and contaminant removal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020;27:22720-22734. DOI 10.1007/s11356-020-08789-y.
- Michaud A.M., Bravin M.N., Galleguillos M., Hinsinger P. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. *Plant Soil.* 2007;298(1-2):99-111. DOI 10.1007/s11104-007-9343-0.
- Nadeem S.M., Naveed M., Ahmad M., Zahir Z.A. Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: mechanisms of action, applications, and future prospects. In: *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. India: Springer, 2015;1-36. DOI 10.1007/978-81-322-2068-8_1.
- Pichhode M., Nikhil K. Effect of copper mining dust on the soil and vegetation in India: a critical review. *Int. J. Mod. Sci. Eng. Technol.* 2015;2(2):73-76.
- Prasad D.D.K., Prasad A.R.K. Altered 5-aminolevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajra (*Pennisetum typhoides*). *J. Plant Physiol.* 1987;127:241-249. DOI 10.1007/BF02702668.
- Prasad M.N.V., Strzalka K. Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (Eds.) *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Berlin: Springer, 1999;117-138. DOI 10.1007/978-3-662-07745-0_6.
- Quartacci M.F., Pinzino C., Sgheri C.L.M., Dalla Vecchia F., Navari-Izzo F. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plantarum.* 2000;108:87-93. DOI 10.1034/j.1399-3054.2000.108001087.x.
- Rai R., Agrawal M., Agrawal S.B. Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. Ch. 6. In: Singh A., Prasad S.M., Singh R.P. (Eds.) *Plant Responses to Xenobiotics*. Singapore: Springer Nature, 2016;127-140. DOI 10.1007/978-981-10-2860-1_6.
- Rais A., Jabeen Z., Shair F., Hafeez F.Y., Hassan M.N. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS One.* 2017;12(11): e0187412. DOI 10.1371/journal.pone.0187412.
- Reis V., Baldani V.L.D., Baldani J.I. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In: Cassán F., Okon Y., Creus C. (Eds.) *Handbook for Azospirillum*. Basel: Springer, 2015;10:978-983. DOI 10.1007/978-3-319-06542-7_1.
- Rothballer M., Schmid M., Hartmann A. *In situ* localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis.* 2003;34:261-279.
- Sayyad G., Afyuni M., Mousavi S.-F., Abbaspour K.C., Hajabasi M.A., Richards B.K., Schulin R. Effects of cadmium, copper, lead, and zinc contamination on metal accumulation by safflower and wheat. *Soil Sediment Contam. Int. J.* 2009;18(2):216-228. DOI 10.1080/15320380802660248.
- Sullivan M.L. Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Front. Plant Sci.* 2015;5:783. DOI 10.3389/fpls.2014.00783.
- Teixeira Filho M.C.M.T., Galindo F.S., Buzetti S., Santini J.M.K. Inoculation with *Azospirillum brasilense* improves nutrition and increases wheat yield in association with nitrogen fertilization. Ch. 6. In: Wanyera R., Owuochi J. (Eds.) *Wheat Improvement, Management and Utilization*. IntechOpen, 2017;99-114. DOI 10.5772/67638.
- Wang H., Zhong G., Shi G., Pan F. Toxicity of Cu, Pb, and Zn on seed germination and young seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). In: Li D., Liu Y., Chen Y. (Eds.) *Computer and Computing Technologies in Agriculture IV*. CCTA 2010. IFIP Advances in Information and Communication Technology. Vol. 346. Berlin; Heidelberg: Springer, 2011;231-240. DOI 10.1007/978-3-642-18354-6_29.
- Wang S., Wu W., Liu F., Liao R., Hu Y. Accumulation of heavy metals in soil-crop systems: a review for wheat and corn. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017;24(18):15209-15225. DOI 10.1007/s11356-017-8909-5.
- Yang Y.-J., Cheng L.-M., Liu Z.-H. Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* 2007;172:632-639. DOI 10.1016/j.plantsci.2006.11.018.
- Yruela I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005;17(1):145-156. DOI 10.1590/S1677-04202005000100012.

ORCID ID

A.Yu. Muratova orcid.org/0000-0003-1927-918X
E.V. Lyubun orcid.org/0000-0002-8814-6949

S.N. Golubev orcid.org/0000-0002-0021-4936
O.V. Turkovskaya orcid.org/0000-0003-4501-4046

Благодарности. Работа выполнена по теме № ГР 121031700141-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.03.2022. После доработки 19.05.2022. Принята к публикации 24.05.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Патогенный потенциал интестинальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых коров и телят в хозяйствах Пермского края

В.С. Михайловская¹, Н.Б. Ремезовская¹, И.Н. Жданова², М. Старчич Эрьявец³, М.В. Кузнецова¹ 

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук –

филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

² Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Лобаново, Пермский край, Россия

³ Университет Любляны, Биотехнологический факультет, Любляна, Словения

 mar19719@yandex.ru

Аннотация. Крупный рогатый скот является резервуаром патогенных и потенциально патогенных *Escherichia coli* (*E. coli*), которые могут представлять угрозу для здоровья людей и животных. Цель исследования – оценить встречаемость 22 вирулент-ассоциированных генов, а также распространенность антибиотикоустойчивости и трех генов *bla* различных типов среди штаммов *E. coli*, выделенных от здорового крупного рогатого скота. Сорок девять штаммов *E. coli* были проанализированы методом ПЦР на присутствие генов, распространенных среди представителей диареогенной *E. coli* (DEC) и внекишечной патогенной *E. coli* (ExPEC). Обнаружены следующие детерминанты, ассоциированные с DEC: *east1* – 24.5 %, *estI* – 10.2 %, *ehxA* – 8.2 %, *stx2* – 6.1 %, *eltA* – 4.1 %, *estII* и *stx1* – 2.0 %. Распространенность генов ExPEC составила: *fimH* – 91.8 %, *afa/draBC* – 61.2 %, *iutA* – 44.9 %, *flu* – 32.7 %, *sfaDE* и *hlyF* – 30.6 %, *iroN* – 22.4 %, *ompT* и *papC* – 20.4 %, *kpsMTII* и *hlyA* – 18.4 %, *iss* – 14.3 %, *usp* – 2.0 %, *cnf1* и *iha* не детектированы. На основании установленных комбинаций генов были определены «классические», гетеропатогенные и гибридные штаммы. Эшерихии, выделенные от коров, обладали более высоким диареогенным потенциалом, а *E. coli*, изолированные от телят, чаще содержали гены, ассоциированные с патотипом ExPEC. Среди исследованных штаммов были устойчивыми: к ампициллину – 77.6 % культур, тетрациклину – 49.0 %, хлорамфениколу – 20.4 %, цефоперазону, цефтриаксону, азтреонаму – 16.3 %, цефепиму – 14.3 %, норфлоксацину и ципрофлоксацину – 10.2 %, левофлоксацину – 6.1 %, гентамицину – 2.0 %, все штаммы были чувствительны к меропенему и амикацину. Фенотип множественной лекарственной устойчивости имели 32.7 % культур, так как они были устойчивы к трем и более группам антибиотиков. Специфическая амплификация выявлена: к *bla*_{TEM} – у 100 % штаммов, к *bla*_{SHV} – у 31.6 %, к *bla*_{CTX-M} – у 26.3 % штаммов, устойчивых хотя бы к одному препарату из группы бета-лактамов антибиотиков. Штаммы *E. coli*, изолированные от здоровых коров и телят, обладали высоким гетеропатогенным потенциалом, поэтому молекулярно-генетическая характеристика этих бактерий должна стать важной частью эпизоотического мониторинга.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; гены, ассоциированные с вирулентностью; устойчивость к антибиотикам; крупный рогатый скот.

Для цитирования: Михайловская В.С., Ремезовская Н.Б., Жданова И.Н., Старчич Эрьявец М., Кузнецова М.В. Патогенный потенциал интестинальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых коров и телят в хозяйствах Пермского края. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):486-494. DOI 10.18699/VJGB-22-59

Virulence potential of faecal *Escherichia coli* strains isolated from healthy cows and calves on farms in Perm Krai

V.S. Mihailovskaya¹, N.B. Remezovskaya¹, I.N. Zhdanova², M. Starčič Erjavec³, M.V. Kuznetsova¹ 

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

² Perm Agricultural Research Institute, Lobanovo, Perm Krai, Russia

³ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Ljubljana, Slovenia

 mar19719@yandex.ru

Abstract. Cattle are a reservoir of pathogenic and potentially pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) strains, which can pose a threat to human and animal health. The aim of the study was to evaluate the occurrence of 22 virulence-associated genes (VAGs), as well as the prevalence of antimicrobial drug resistance and three different *bla*-genes among 49 *E. coli* strains isolated from healthy cattle. The presence of VAGs that are common among diarrheagenic *E. coli* (DEC) strains and/or extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains was determined by amplifying specific gene sequences by PCR. The following VAGs associated with DEC were found: *east1* in 24.5 % of the studied *E. coli* strains, *estI* in 10.2 %, *ehxA* in 8.2 %, *stx2* in 6.1 %, *eltA* in 4.1 %, *estII* and *stx1* in 2.0 % of the studied strains. The prevalence of ExPEC VAGs was: *fimH* – 91.8 %, *afa/draBC* – 61.2 %, *iutA* – 44.9 %, *flu* – 32.7 %, *sfaDE* and *hlyF* – 30.6 %, *iroN* – 22.4 %, *ompT* and *papC* –

20.4 %, *kpsMTII* and *hlyA* – 18.4 %, *iss* – 14.3 %, *usp* – 2.0 %, *cnf1* and *iha* were not detected among the studied strains. Based on the found co-occurrence of VAGs “classical”, hetero-pathogenic and hybrid-pathogenic *E. coli* strains were found. *E. coli* strains isolated from cows had a higher diarrheagenic potential, whereas *E. coli* strains isolated from calves more frequently contained genes associated with the ExPEC pathotype. Among the studied *E. coli* strains, 77.6 % were resistant to ampicillin, 49.0 % to tetracycline, 20.4 % to chloramphenicol, 16.3 % to cefoperazone, 16.3 % to ceftriaxone, 16.3 % to aztreonam, 14.3 % to cefepime, 10.2 % to norfloxacin, 10.2 % to ciprofloxacin, 6.1 % to levofloxacin and 2.0 % to gentamicin. All strains were sensitive to meropenem and amikacin. 32.7 % of the studied *E. coli* strains were found to be multidrug resistant, as they were resistant to at least three groups of antibiotics. With PCR, the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{CTX-M} genes were detected in 100, 31.6, and 26.3 %, respectively, of strains resistant to at least one of the beta-lactam antibiotics. Thus, it was shown that the studied faecal *E. coli* of healthy cows and calves had a high hetero-pathogenic potential, therefore in the future molecular genetic characterization of these bacteria shall be an important part of the epizootic monitoring.

Key words: *Escherichia coli*; virulence-associated genes (VAGs); antibiotic resistance; cattle.

For citation: Mihailovskaya V.S., Remezovskaya N.B., Zhdanova I.N., Starčić Erjavec M., Kuznetsova M.V. Virulence potential of faecal *Escherichia coli* strains isolated from healthy cows and calves on farms in Perm Krai. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):486-494. DOI 10.18699/VJGB-22-59

Введение

Представители комменсальной микробиоты, включая *Escherichia coli*, являясь облигатными обитателями кишечного тракта сельскохозяйственных животных, поддерживают физиологический гомеостаз и колонизационную резистентность организма. Крупный рогатый скот, в том числе здоровые животные, представляют собой резервуар патогенных и условно-патогенных эшерихий (Chapman et al., 2006; Ewers et al., 2009; Bok et al., 2015; Madoshi et al., 2016). Диареогенные *E. coli* (DEC), вызывающие вспышки кишечных заболеваний, включают различные патотипы: энтеропатогенные (EPEC), энтероинвазивные (EIEC), энтероагрегативные (EAEC), энтеротоксигенные (ETEC) и энтерогеморрагические (EHEC) *E. coli*, среди которых выделяют продуцирующие шига-подобные токсины (STEC) (Allocati et al., 2013; Vila et al., 2016; Oporto et al., 2019; Santos et al., 2020).

Штаммы *E. coli*, которые могут обуславливать инфекционный процесс во внекишечных локусах (ExPEC), принято подразделять на уропатогенные (UPEC), вызывающие менингиты новорожденных (NMEC), патогенные для птиц (APEC) и ассоциированные с сепсисом (SePEC). Циркулирующие в условиях сельскохозяйственных предприятий штаммы интестинальной и экстраинтестинальной *E. coli* могут представлять существенную опасность для здоровья животных и людей.

Геном эшерихий отличается высокой степенью гетерогенности, что опосредовано возможностью горизонтального переноса детерминант, ассоциированных с вирулентностью. В результате появляются гибридные и гетеропатогенные представители, сочетающие комбинации генов, характерные для разных патотипов эшерихий (Santos et al., 2020). Наряду с этим формируется патогенный потенциал симбиотических *E. coli*, которые становятся источниками вирулент-ассоциированных генов для других микроорганизмов либо впоследствии сами вызывают кишечные или внекишечные инфекции (Chapman et al., 2006; Bélanger et al., 2011).

Широкое применение антибиотиков в сельском хозяйстве приводит к формированию штаммов *E. coli* с фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) (Pardon et al., 2017). Литературные данные о связи детерминант патогенности с резистентностью к противомикробным препаратам носят противоречивый характер:

в ряде работ была выявлена корреляция между фенотипической устойчивостью к антибиотикам и наличием отдельных вирулент-ассоциированных генов (Suojala et al., 2010; de Verdier et al., 2012), в других работах она отсутствовала (Bok et al., 2015). В России исследования по встречаемости гибридных и гетеропатогенных штаммов *E. coli*, циркулирующих среди здоровых животных сельскохозяйственных предприятий, не проводились. В связи с этим анализ генетических профилей патогенности и антибиотикорезистентности штаммов *E. coli* – облигатных представителей кишечной микробиоты крупного рогатого скота, важен в отношении как эпизоотического, так и эпидемиологического контроля за эшерихиозами в животноводческих хозяйствах.

Цель настоящей работы – оценить встречаемость 22 вирулент-ассоциированных генов, а также распространенность антибиотикостойчивости и трех генов *bla* различных типов среди штаммов *E. coli*, выделенных от здорового крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Исследованные штаммы. Использованы штаммы *E. coli* ($n = 49$) с индивидуальным генетическим профилем (согласно ERIC-ПЦР), выделенные в 2019–2021 гг. на предприятиях промышленного животноводства ($n = 3$) и частных фермерских хозяйствах ($n = 5$) Пермского края из фекалий коров ($n = 31$) и телят от 3 до 13 дней жизни ($n = 18$). Штаммы получены от разных животных голштинской черно-пестрой породы. Сельскохозяйственные предприятия ООО АПК «Красава», ООО «Сергинское» и ООО «Русь» специализируются на разведении молочного крупного рогатого скота и производстве сырого молока. Хозяйственный рацион кормления и условия содержания животных (беспривязный способ) одинаковы и типичны для данных предприятий.

Детекция генов, ассоциированных с вирулентностью. Для получения ДНК петлю бактериальной биомассы инокулировали в 100 мкл сверхчистой воды, 15 мин прогревали при 97 °C в твердотельном термостате «Термит» (Россия), пробы охлаждали, центрифугировали 5 мин при 13 тыс. об/мин. Супернатанты применяли в генетических исследованиях. Методом ПЦР по конечной точке детектировали 22 гена, кодирующих токсины (*hlyA*, *hlyF*, *east1*, *ehxA*, *estI*, *estII*, *eltA*, *stx1*, *stx2*, *cnf1*),

адгезины (*fimH*, *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *iha*, *flu*), протеины (*ompT*, *kpsMTII*, *iss*), белки систем поглощения железа (*iron*, *iutA*) и белок, специфический для UPEC (*usp*). Использовали праймеры (ООО «Синтол», Москва) и программы по рекомендациям из работ (Charman et al., 2006; Moulin-Schouleur et al., 2007). Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-DocXR (Bio-Rad).

Тестирование чувствительности к противомикробным препаратам. Определение чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04 и клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам» межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ, версия-2018-03). Штаммы были проверены диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и дисков (НИЦФ, Санкт-Петербург) на чувствительность к пенициллинам (ампициллину, 10 мкг), цефалоспорином (цефоперазону, 75 мкг; цефтриаксону, 30 мкг; цефепиму, 30 мкг), карбапенемам (меропенему, 10 мкг), монобактамам (азтреонаму, 30 мкг), аминогликозидам (амикацину, 30 мкг; гентамицину, 10 мкг), фторхинолонам (ципрофлоксацину, 5 мкг; левофлоксацину, 5 мкг; норфлоксацину, 10 мкг), тетрациклинам (тетрациклину, 30 мкг), фениколам (хлорамфениколу, 30 мкг). Нечувствительность штаммов хотя бы к одному препарату трех и более групп антибиотиков была определена как МЛУ (Magiorakos et al., 2012).

Идентификация генов бета-лактамаз. Детекцию генов, кодирующих бета-лактамазы TEM, SHV и CTX-M типов, осуществляли с помощью ПЦР по конечной точке с использованием праймеров и режимов амплификации, согласно рекомендациям из работ (Ahmed et al., 2007; Aleisa et al., 2013).

Статистический анализ. Сравнение качественных признаков выполняли с применением точного критерия Фишера. Обработку данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и Statistica 10.0.

Результаты

Молекулярная характеристика популяции *E. coli*

Оценка распространенности генов, ассоциированных с диареегенными патотипами (*east1*, *ehxA*, *estI*, *estIII*, *eltA*, *stx1*, *stx2*), и генов внекишечных патогенных *E. coli* (*fimH*, *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *flu*, *hlyA*, *hlyF*, *ompT*, *kpsMTII*, *iss*, *iron*, *iutA*, *usp*) показала, что они встречались с разной частотой. Детерминанты *iha* и *cnf1* не обнаружены (табл. 1). У всех штаммов детектирован хотя бы один вирулент-ассоциированный ген. Чаще всего встречались представители *E. coli*, содержащие три (20.4%), четыре (14.3%), пять (20.4%) и шесть (16.3%) генов, в то время как доля эшерихий, имеющих семь и более генов, не превышала 10%. Всего по сочетанию генов, ассоциированных с вирулентностью, выявлено 45 вариантов их комбинаций.

Распространенность генов, ассоциированных с патогенностью DEC. Семнадцать штаммов (34.7%) содержали гены, связанные с патотипами DEC. Среди детерминант, кодирующих токсины, наиболее распространенным был ген энтероагрегативного термостабильного энтеротоксина *east1* (24.5%), который обычно, но не исключительно, ассоциирован с EAEC. Семь штаммов (14.3%) несли гены, связанные с ETEC (*estI*, *estIII*, *eltA*), четыре культуры содержали гены-маркеры STEC *stx1* (2.0%) и *stx2* (6.1%). В четырех случаях был обнаружен *ehxA*, кодирующий энтерогемолизин, который является основным фактором вирулентности EHEC, но также встречается среди представителей прочих диареегенных патотипов (Jiang et al., 2015). Выделен гетеропатогенный штамм, содержащий одновременно гены-маркеры патотипов STEC и ETEC. Следует отметить, что у некоторых эшерихий, определенных как STEC и ETEC, был детектирован ген *east1*. Распределение в изучаемой популяции *E. coli* детерминант, ассоциированных с патотипами DEC, показано на рис. 1.

Распространенность генов, ассоциированных с патогенностью EхPEC. Ген *fimH*, ответственный за уролегиальную адгезию посредством адгезина фимбрий 1-го типа, был самым распространенным (91.8%). Вторым по встречаемости оказался ген афимбриального адгезина *afa/draBC* (61.2%), также достаточно часто детектировали *iutA* (44.9%). Распространенность детерминант *papC*, *sfaDE*, *flu*, *hlyA*, *hlyF*, *ompT*, *kpsMTII*, *iss*, *iron* варьировала от 14.3 до 32.7%. Лишь в одном случае был детектирован ген *usp*.

Более половины штаммов (55.1%) соответствовали критерию классификации EхPEC, согласно (Johnson, Russo, 2005), т.е. содержали два и более из следующих генов: *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, *kpsMTII*, *iutA*. Интересно, что восемь штаммов включали хотя бы три из пяти генов (*hlyF*, *iron*, *ompT*, *iss*, *iutA*), которые были предложены T.J. Johnson с коллегами (2008) для определения патотипа APEC, связанного с системным колибактериозом птиц. Один штамм обладал высоким уропатогенным потен-

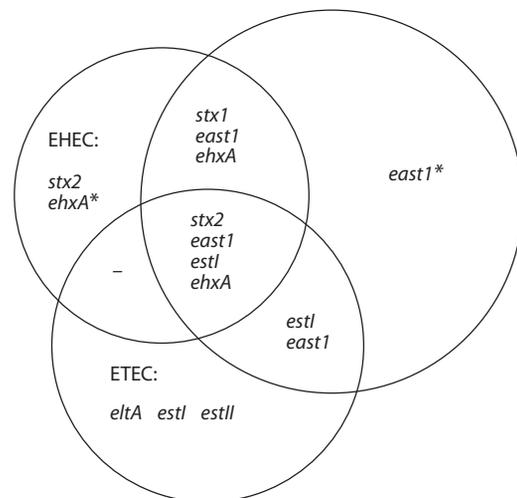


Рис. 1. Варианты распределения генов, ассоциированных с патотипами DEC.

* Ген ассоциирован более чем с одним патотипом.

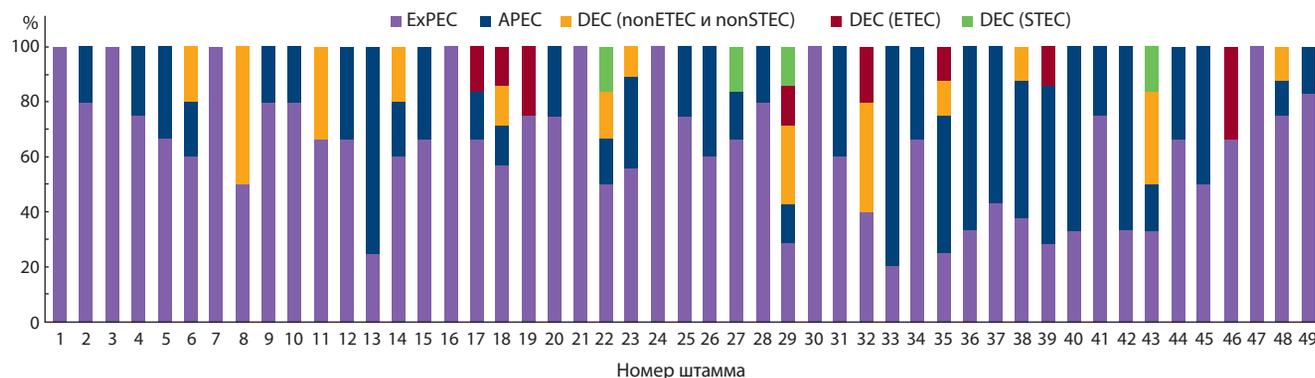


Рис. 2. Соотношение генов, ассоциированных с патотипами АРЕС, STEС, ETEС, прочих генов ExPEC и DEC в штаммах, выделенных от здоровых коров и телят.

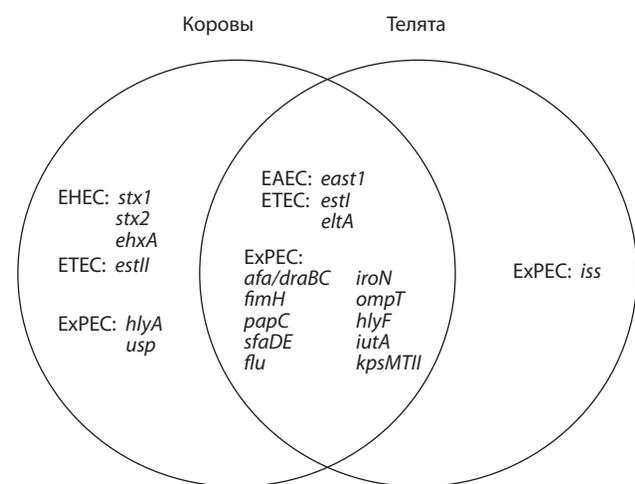


Рис. 3. Распределение детерминант патогенности среди штаммов, изолированных от здоровых коров и телят.

циалом, поскольку содержал ген *usp*, а также гены *hlyA*, *papC*, *sfaDE*, *afa/draBC*, часто обнаруживаемые среди представителей UPEC.

На основании выявленных комбинаций генов определены не только «классические», но и гибридные штаммы. Обнаружено 11 (22.5 %) культур, которые соответствовали критерию ExPEC и включали гены, ассоциированные с патотипами DEC (*estI*, *stx2*, *east1*, *ehxA*). Среди них были гибридные патотипы ExPEC/STEC и ExPEC/ETEC, однако они встречались не более чем в 4.1 % случаев. Соотношение генов, ассоциированных с ExPEC и DEC, детектированных в исследуемой популяции эшерихий, представлено на рис. 2.

Сравнительный анализ распространенности генов вирулентности в субпопуляциях *E. coli*, выделенных от телят и взрослых животных. Между выборками установлены определенные статистические различия в распространенности детерминант патогенности (см. табл. 1). Ген *iss* детектировали только среди эшерихий, выделенных от телят, а гены *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *estI*, *hlyA*, *usp* встречались исключительно у коровых штаммов. Ген *ompT* был обнаружен достоверно чаще у *E. coli*, циркулирующих среди телят ($p = 0.03$), в то время как распро-

страненность генов *afa/draBC* ($p = 0.03$) и *iroN* ($p = 0.04$) оказалась выше в субпопуляции *E. coli*, изолированных от взрослых животных. Кроме того, среди последних чаще встречались гены *fimH*, *papC*, *sfaDE*, *estI*, *east1*, *kpsMTII*, но разница не была статистически достоверной (рис. 3).

Характеристика резистентности к антимикробным препаратам штаммов *E. coli*

Доля штаммов, чувствительных ко всем изученным антибиотикам, составила 12.2 %. В популяции наиболее распространенными оказались *E. coli*, резистентные только к одному препарату (36.7 %). Культуры чаще были устойчивы к ампициллину (77.6 %) и тетрациклину (49.0 %) (табл. 2). Нужно отметить, что к меропенему и амикацину были чувствительны все штаммы.

Фенотипом МЛУ обладали 16 культур (32.7 %), при этом три штамма были не чувствительны хотя бы к одному препарату из пяти и более групп антибиотиков. Из 14 определенных фенотипических профилей антибиотикорезистентности семь были уникальными (не повторялись более одного раза). Чаще всего встречались штаммы с фенотипом устойчивости к ампициллину (32.7 %), ампициллину и тетрациклину (12.3 %), а также ампициллину, тетрациклину и хлорамфениколу (10.2 %).

Распространенность генов резистентности к бета-лактамам. Тридцать восемь штаммов *E. coli* (77.6 %) были устойчивы хотя бы к одному препарату из группы бета-лактамов антибиотиков. Эти штаммы были протестированы на присутствие генов бета-лактамаз. Специфическая амплификация к bla_{TEM} выявлена в 100 % случаев, к bla_{SHV} – 31.6 %, к bla_{CTX-M} – 26.3 %.

Сравнительный анализ распространенности лекарственной устойчивости в субпопуляциях *E. coli*, выделенных от телят и взрослых животных. Штаммы, резистентные к гентамицину и норфлоксацину, были обнаружены только среди эшерихий, полученных от телят. В этой же выборке встречаемость представителей *E. coli*, не чувствительных к тетрациклину и хлорамфениколу, а также обладающих фенотипом МЛУ, оказалась значимо выше ($p < 0.01$). Доля штаммов, резистентных к прочим антимикробным агентам, также была больше в группе телят, хотя различия не были статистически достоверными (см. табл. 2).

Таблица 1. Встречаемость вирулент-ассоциированных генов среди штаммов *E. coli*, изолированных от здоровых животных

Фактор вирулентности	Ген	Патотип	Встречаемость, %		
			Коровы	Телята	Все животные
Факторы адгезии					
Адгезин бифункционального энтеробактериального рецептора	<i>iha</i>	EHEC	0	0	0
Антиген Ag43а	<i>flu</i>	ExPEC	25.8	44.4	32.7
Антигенсвязывающий адгезин	<i>afa/draBC</i>	ExPEC	74.2	39.8*	61.2
Фимбрии 1-го типа	<i>fimH</i>	ExPEC	96.8	83.3	91.8
P-фимбрии	<i>papC</i>	ExPEC	22.6	16.7	20.4
S-фимбрии	<i>sfaDE</i>	ExPEC	32.3	27.8	30.6
Токсины					
Гемолизин А	<i>hlyA</i>	ExPEC	29.0	0	18.4
Гемолизин F	<i>hlyF</i>	ExPEC	19.4	30.0	30.6
Термолабильный энтеротоксин	<i>eltA</i>	EPEC	3.2	3.6	4.1
Термостабильный энтеротоксин а	<i>est1</i>	EPEC	12.9	5.6	10.2
Термостабильный энтеротоксин b	<i>estII</i>	EPEC	3.2	0	2.0
Цитотоксический некротический фактор	<i>cnf1</i>	ExPEC	0	0	0
Шига-подобный токсин 1-го типа	<i>stx1</i>	STEC	3.2	0	2.0
Шига-подобный токсин 2-го типа	<i>stx2</i>	STEC	9.7	0	6.1
Энтероагрегативный термостабильный энтеротоксин	<i>east1</i>	EAEC	22.6	27.8	24.5
Энтерогемолизин	<i>ehxA</i>	EPEC, EHEC	12.9	0	8.2
Факторы, обеспечивающие поглощение железа					
Катехолатный сидерофор	<i>iroN</i>	ExPEC	32.3	5.6	22.4
Рецептор сидерофора аэробактерина	<i>iutA</i>	ExPEC	25.8	77.8	44.9
Протектины					
Белок резистентности к сыворотке	<i>iss</i>	ExPEC	0	38.9	14.3
Капсульный антиген II группы	<i>kpsMTII</i>	ExPEC	22.6	11.1	18.4
Протеаза наружной мембраны	<i>ompT</i>	ExPEC	9.7	39.8*	20.4
Прочие факторы					
Белок, специфичный для UPEC	<i>usp</i>	ExPEC	3.2	0	2.0

* Разница между выборками статистически значима, $p \leq 0.05$.

Связь между факторами вирулентности и устойчивостью к противомикробным препаратам

В группе штаммов с фенотипом МЛЮ чаще наблюдались *E. coli*, содержащие пять и более генов патогенности ($p = 0.04$), также вероятность встретить гены *hlyA*, *iss*, *iutA* в этой группе была выше, чем среди эшерихий без фенотипа МЛЮ ($p \leq 0.05$). В выборке штаммов, у которых было детектировано пять и более генов патогенности, доля эшерихий, резистентных к пяти и более антимикробным агентам, была значимо выше ($p = 0.04$). Следует отметить, что среди *E. coli* с фенотипом МЛЮ встречались эшерихии, содержащие гены-маркеры *estI*, *eltA* (EPEC), *stx1* (STEC), а также шесть штаммов, идентифицированных как APEC.

Обсуждение

Штаммы *E. coli*, циркулирующие в условиях сельскохозяйственных предприятий, могут представлять существенную опасность для здоровья людей (Bélangier et al., 2011; Manges et al., 2016). С одной стороны, выявлена воз-

можность трансмиссии патогенных культур *E. coli* через продукты питания, в том числе мясо крупного рогатого скота (Vincent et al., 2010). С другой стороны, наличие у представителей *E. coli*, вызывающих заболевания человека, и *E. coli* животного происхождения сходных филогрупп, серотипов и генетических детерминант патогенности позволяет предположить, что животные могут быть резервуаром условно-патогенных эшерихий, а также возбудителей зоонозных инфекций (Tivendale et al., 2010; Mora et al., 2013). Например, сельскохозяйственные животные служат основным естественным резервуаром и источником STEC-штаммов, вызывающих геморрагический колит у людей (Онищенко и др., 2015).

Наличие определенных факторов вирулентности у возбудителя обуславливает проявление клинической симптоматики кишечных и внекишечных инфекций, вызванных эшерихиями, соответствующих патогрупп – DEC и ExPEC (Chapman et al., 2006; Dale, Woodford, 2015). Согласно литературным данным, эти штаммы могут циркулировать среди аутофлоры здоровых животных, не имеющих

Таблица 2. Распространенность устойчивости к антибиотикам

Группа антибиотиков	Антимикробный агент	Устойчивые штаммы, %		
		Коровы	Телята	Все животные
Пенициллины	Ампициллин	71.0	88.9	77.6
Цефалоспорины	Цефоперазон	12.9	22.2	16.3
	Цефтриаксон	12.9	22.2	16.3
	Цефепим	9.7	22.2	14.3
Монобактамы	Азтреонам	12.9	22.2	16.3
Карбапенемы	Меропенем	0	0	0
Аминогликозиды	Гентамицин	0	5.6	2.0
	Амикацин	0	0	0
Фторхинолоны	Левифлоксацин	3.2	11.1	6.1
	Норфлоксацин	0	27.8	10.2
	Ципрофлоксацин	3.2	22.2	10.2
Тетрациклины	Тетрациклин	22.6	94.4*	49.0
Фениколы	Хлорамфеникол	3.2	50*	20.4

* Разница между выборками статистически значима, $p \leq 0.05$.

выраженных симптомов заболевания, кроме того, в геномах комменсальных эшерихий могут присутствовать некоторые вирулент-ассоциированные гены (Orden et al., 2002; Ewers et al., 2009, 2021; Bok et al., 2015). Наши исследования показали, что штаммы *E. coli*, выделенные от здорового крупного рогатого скота, характеризовались высоким уровнем генетического разнообразия и содержали детерминанты патогенности, ассоциированные с патотипами DEC и ExPEC. Наиболее часто встречались штаммы ExPEC (55.1 %), также были обнаружены эшерихии, содержащие гены-маркеры диареогенных патотипов EHEC (в том числе STEC в 8.1 % случаев) и ETEC (14.3 %). Сходные данные представлены в работе J.A. Orden с коллегами: среди штаммов, полученных от здорового крупного рогатого скота, встречались представители STEC, EPEC и NTEC с частотами 8.7, 8.2 и 9.9 % соответственно (Orden et al., 2002). Тогда как распространенность штаммов *E. coli* патотипов ETEC и STEC, выделенных от коров молочного стада в Китае, составила только 4.29 и 1.98 % (Huasai et al., 2012). Нужно отметить, что в нашей выборке отдельные гены патогенности детектировались с достаточно высокой частотой (*fimH* – 91.8 %; *afa/draBC* – 61.2 %; *iutA* – 44.9 %; *sfaDE* – 30.6 %). В работе (Pereira et al., 2011) показано, что гены *fimH* и *iutA* встречались среди *E. coli*, изолированных от здоровых телят, чаще – в 100 и 86.9 % случаев соответственно, тогда как гены *sfaDE* и *afa/draBC* обнаруживались реже – у 4.9 и 1.6 % культур.

При сравнении распространенности детерминант патогенности у штаммов, циркулирующих среди здорового крупного рогатого скота предприятий России и Словении, было установлено, что представители выборки из Словении обладали меньшим патогенным потенциалом, так как встречаемость генов оказалась значительно ниже: *fimH* – 65.2 %, *hlyA* – 9.0 %, *stx2*, *ompT* и *kpsMT* – 3.4 %, *usp* – 1.1 %, а гены *sfaDE*, *iroN*, *cnf1* не были найдены вообще (данные не представлены).

В последнее время все больше исследователей отмечают, что гены патогенности, связанные либо с ExPEC, либо с DEC, выявляются среди *E. coli*, отнесенных к патотипам, с которыми они традиционно не ассоциировались (Santos et al., 2020; Ewers et al., 2021). Такие штаммы могут стать причиной тяжелых инфекционных заболеваний как сельскохозяйственных животных, так и людей. В 2011 г. в Германии была зафиксирована вспышка пищевого отравления, вызванная гетеропатогенным штаммом *E. coli* O104:H4 с редкой комбинацией вирулентных генов (*stx2* и *aatA*, *aggR*, *aap*, *aggA*, *aggC*), характерных для двух разных групп диареогенных эшерихий – STEC и EAEC (Bielaszewska et al., 2011). Сообщается, что гетеропатогенные штаммы могут быть выделены от животных и из продуктов питания (Cheng et al., 2006; Monday et al., 2006).

В изучаемой выборке были найдены штаммы, включающие гены *stx1*, *stx2* и ген энтероагрегативного термостабильного энтеротоксина *east1*, который часто встречается у представителей EAEC. Однако для определения этого патотипа необходимы выявление дополнительных детерминант, а также фенотипические исследования (Boisen et al., 2020). Гибриды ExPEC/STEC также являются патогенами высокого риска, поскольку вызывают одновременно диарею и внекишечную инфекцию. Частота встречаемости подобных вариантов невысока, тем не менее нами были обнаружены гибридные и гетеропатогенные штаммы в 2.0 и 4.1 % случаев соответственно.

Профили генов патогенности штаммов *E. coli*, циркулирующих среди здоровых коров и телят, имеют специфические отличия. Встречаемость большинства генов (за исключением *ompT*, *hlyF*, *iutA*) оказалась выше среди *E. coli*, изолированных от взрослых животных, более того, детерминанты патогенности *stx1*, *stx2*, *ehxA*, *estII*, ассоциированные с DEC, были детектированы исключительно в данной выборке. Интересно, что среди *E. coli*, выделенных от телят от 3 до 13 дней жизни, чаще были детектированы детерминанты *ompT*, *hlyF*, *iutA*, *iss*. Таким

образом, высоким диареогенным потенциалом обладали эшерихии, обитающие в кишечнике здоровых коров, тогда как детерминанты ExPEC были распространены в обеих выборках, с той разницей, что у эшерихий, изолированных от телят, чаще встречались гены, ассоциированные с внекишечным патотипом АРЕС. Возможно, эти отличия связаны с тем, что бактерии патогрупп DEС могут персистировать в кишечнике взрослых особей, не вызывая активной инфекции, поскольку «зрелый» микробиом обеспечивает колонизационную резистентность, тогда как телята более уязвимы к DEС, которые часто становятся причиной диареи и гибели молодняка в первые дни жизни (Bashahun, Amina, 2017). Кроме того, естественный иммунитет, сформированный у переболевших ранее взрослых животных, а также поствакцинальный иммунитет обеспечивают толерантность к большей части патогенных эшерихий.

На сельское хозяйство приходится до 70 % потребления противомикробных препаратов, поэтому продуктивные животные служат основной ареной возникновения бактериальной антибиотикоустойчивости и появления штаммов со множественной резистентностью (Berge et al., 2009; Pereira et al., 2011; Okello et al., 2021). Показано, что среди изолятов *E. coli*, выделенных от животных сельскохозяйственных предприятий, более половины имели фенотип МЛУ¹.

Существенные различия в распространенности антибиотикорезистентных микроорганизмов, циркулирующих в животноводческих хозяйствах разных стран, могут быть обусловлены особенностями условий содержания животных и применением антимикробных препаратов, что определяет целесообразность сравнительного изучения путей передачи и механизмов приобретения устойчивости к антибиотикам.

Для лечения и профилактики инфекционных заболеваний крупного рогатого скота в ветеринарии наиболее широко используются бета-лактамы антибиотики и препараты тетрациклинового ряда (Berge et al., 2009; Pereira et al., 2011). Особое значение имеет растущая устойчивость микроорганизмов к цефалоспорином расширенного спектра действия (третьего и четвертого поколений), поскольку эта группа препаратов входит в список антибиотиков, критически важных для медицины². По данным нашего исследования, выделенные от здоровых коров и телят штаммы с фенотипом МЛУ встречались с достаточно высокой частотой (32.7 %). В изучаемой выборке 77.6 % культур были устойчивы хотя бы к одному антимикробному агенту группы бета-лактамы антибиотиков (16.3 % – к цефоперазону и цефтриаксону, 49 % – к тетрациклину, 20.4 % – к хлорамфениколу). Эти данные значительно превышают показатели, полученные В.Р. Madoshi с коллегами (2016), согласно которым доля штаммов, изолированных от здорового крупного рогатого скота и устойчивых к ампициллину, тетрациклину и хлорамфениколу, составила соответственно 21.3, 33.1

и 4.4 %. К цефотаксиму устойчивыми оказались только 3.7 % культур (Madoshi et al., 2016). Еще более низкую устойчивость к цефалоспорином (1.5 %) продемонстрировали штаммы эшерихий, выделенные из фекалий крупного рогатого скота на сельскохозяйственных предприятиях Японии (Sato et al., 2014).

Производство бета-лактамаз – один из основных механизмов устойчивости к бета-лактамам антибиотикам. У исследуемых нами штаммов, резистентных хотя бы к одному агенту из этой группы антимикробных препаратов, обнаружены гены и комбинации генов бета-лактамаз семейств TEM, SHV и CTX-M. Этот факт может быть связан с широким использованием бета-лактамы антибиотиков на предприятиях Пермского края, однако было выявлено, что даже среди культур, выделенных от крупного рогатого скота на фермах, где антибиотики применялись редко, встречаемость *bla*_{CTX-M} колебалась от 2.3 до 25.0 % (Lee et al., 2020). Тем не менее следует обратить внимание на высокую встречаемость в штаммах *E. coli* детерминант, кодирующих бета-лактамазы, плазмидная локализация которых может способствовать эффективному распространению антибиотикоустойчивости внутри микробной популяции путем горизонтального переноса.

Согласно нашим данным, в целом устойчивость к антимикробным агентам была чаще распространена в субпопуляции эшерихий, выделенных от телят, чем среди *E. coli*, изолированных от взрослых животных. Наибольшие различия наблюдались в отношении тетрациклина (94.4 против 22.6 %) и хлорамфеникола (50.0 против 3.2 % устойчивых штаммов от телят и коров соответственно). Возможно, это связано с добавлением в корм телят именно этих препаратов в течение продолжительного периода, поскольку известно, что антибиотики часто добавляют в молоко или заменители молока с целью профилактики заболеваний и лечения диареи – основной причины смертности телят до отъема (Berge et al., 2009; de Campos et al., 2021; Okello et al., 2021).

Известно, что фенотип резистентности бактерий, циркулирующих среди телят, в основном является следствием использования противомикробных препаратов на конкретных предприятиях (DeFrancesco et al., 2004; Sato et al., 2005). Большое значение для профилактики и лечения стрептококковых и стафилококковых инфекций у телят имеют антибиотики аминогликозидной группы – неомидин и гентамицин³. Это может объяснить то, что штаммы *E. coli*, устойчивые к гентамицину и норфлоксацину, были обнаружены только среди эшерихий, полученных от телят.

Заключение

Микробиологический мониторинг патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животного происхождения, осуществляется в настоящее время на всех предприятиях РФ. Важность контроля обусловлена тем, что бактерии циркулируют в стаде длительное время, перемещаясь среди животных всех возрастов. Это

¹ Забровская А.В. Эпизоотологический анализ распространения антибиотикорезистентных штаммов возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных в Северо-Западном федеральном округе Российской Федерации: Дис. ... д-ра вет. наук. Санкт-Петербург, 2019. 323 с.
² Antibiotics in Animal Farming. Public Health and Animal Welfare, 2011.

³ Есауленко Н.Н. Эффективность использования пробиотика «Споротермин» в рационах для телок: Дис. ... канд. с.-х. наук. Краснодар, 2015. 118 с.

представляет риск как для самих животных, так и для персонала сельскохозяйственных предприятий.

В нашей работе впервые представлены данные о распространенности вирулент-ассоциированных генов, а также встречаемости гибридных и гетеропатогенных штаммов *E. coli*, циркулирующих среди здоровых животных на сельскохозяйственных предприятиях европейской части России (Пермский край). Кроме того, проанализирована связь между патогенным потенциалом эшерихий и их антибиотикоустойчивостью. Еще одним важным аспектом в этой работе является сравнительный анализ биологических свойств штаммов *E. coli*, изолированных от разных возрастных групп животных – коров и телят.

Проведенные исследования показали, что штаммы *E. coli*, циркулирующие среди здоровых животных на фермах и предприятиях животноводства, характеризовались высоким гетеропатогенным потенциалом. В рассматриваемой популяции эшерихий были распространены представители DEC (в том числе STEC и ETEC), которые могут стать причиной острых кишечных инфекций, а также ExPEC, обуславливающие внекишечные инфекции. Кроме того, были обнаружены гибридные эквары, сочетающие гены, ассоциированные с разными патотипами *E. coli*. Культуры с фенотипом МЛЮ обладали высоким патогенным потенциалом, поскольку чаще содержали более пяти вирулент-ассоциированных генов. Эшерихии, выделенные от коров, демонстрировали более высокий диареогенный потенциал, а *E. coli*, изолированные от телят, чаще содержали гены, ассоциированные с патотипом ExPEC. Последние в целом проявляли большую устойчивость к антимикробным агентам, чем *E. coli*, изолированные от взрослых животных.

Полученные данные о молекулярных свойствах представителей кишечной микробиоты здорового крупного рогатого скота позволяют оценить их эпизоотическую значимость и могут служить основой для формирования системы мониторинга колибактериоза на сельскохозяйственных предприятиях.

Список литературы / References

Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Баннов В.А., Карцев Н.Н., ... Бушманова О.Н., Сталевская А.В., Чхинджерия И.Г., Жебрун А.Б. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестн. Рос. акад. мед. наук.* 2015;70(1):70-81. DOI 10.15690/vramn.v70i1.1234.
[Onishchenko G.G., Dyatlov I.A., Svetoch E.A., Volozhantsev N.V., Bannov V.A., Kartsev N.N., ... Bushmanova O.N., Stalevskaya A.V., Tekhinjeriya I.G., Zhebrun A.B. Molecular-genetic characterization of shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated during a food-borne outbreak in St. Petersburg in 2013. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2015;70(1):70-81. DOI 10.15690/vramn.v70i1.1234. (in Russian)]
Ahmed A.M., Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H., Fukumoto Y., Shimamoto T. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(20):6686-6690. DOI 10.1128/AEM.01054-07.
Aleisa A.M., Ashgan M.H., Alnasserallah A.A., Mahmoud M.H., Moussa I.M. Molecular detection of β -lactamases and aminoglycoside resistance genes among *Escherichia coli* isolates recovered

from medicinal plant. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2013;7(20):2305-2310. DOI 10.5897/AJMR12.1965.
Allocati N., Masulli M., Alexeyev M.F., Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013;10(12):6235-6254. DOI 10.3390/ijerph10126235.
Bashahun G.M., Amina A. Colibacillosis in calves: A review of literature. *J. Anim. Sci. Vet. Med.* 2017;2(3):62-71. DOI 10.31248/JASVM2017.041.
Bélangier L., Garenaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., Dozois C.M. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011;62(1):1-10. DOI 10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x.
Berge A.C., Moore D.A., Besser T.E., Sisco W.M. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: effects on health, growth, and treatment costs. *J. Dairy Sci.* 2009;92(9):4707-4714. DOI 10.3168/jds.2009-2199.
Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2011;11(9):671-676. DOI 10.1016/S1473-3099(11)70165-7.
Boisen N., Østerlund M.T., Joensen K.G., Santiago A.E., Mandomando I., Cravioto A., Chattaway M.A., Gonyar L.A., Overballe-Petersen S., Stine O.C., Rasko D.A., Scheutz F., Nataro J.P. Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14(9):e0008613. DOI 10.1371/journal.pntd.0008613.
Bok E., Mazurek J., Stosik M., Wojciech M., Baldy-Chudzick K. Prevalence of virulence determinants and antimicrobial resistance among commensal *Escherichia coli* derived from dairy and beef cattle. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015;12(1):970-985. DOI 10.3390/ijerph120100970.
Chapman T.A., Wu X.-Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.J.-C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrhetic swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(7):4782-4795. DOI 10.1128/AEM.02885-05.
Cheng D., Sun H., Xu J., Gao S. PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Vet. Microbiol.* 2006;115(4):320-328. DOI 10.1016/j.vetmic.2006.02.013.
Dale A.P., Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J. Infect.* 2015;71(6):615-626. DOI 10.1016/j.jinf.2015.09.009.
de Campos J.L., Kates A., Steinberger A., Sethi A., Suen G., Shutske J., Safdar N., Goldberg T., Ruegg P.L. Quantification of antimicrobial usage in adult cows and preweaned calves on 40 large Wisconsin dairy farms using dose-based and mass-based metrics. *J. Dairy Sci.* 2021;104(4):4727-4745. DOI 10.3168/jds.2020-19315.
de Verdier K., Nyman A., Greko C., Bengtsson B. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Vet. Scand.* 2012;54(1):2. DOI 10.1186/1751-0147-54-2.
DeFrancesco K.A., Cobbold R.N., Rice D.H., Besser T.E., Hancock D.D. Antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* from dairy cattle associated with recent multi-resistant salmonellosis outbreaks. *Vet. Microbiol.* 2004;98(1):55-61. DOI 10.1016/j.vetmic.2003.10.017.
Ewers C., Antao E.M., Diehl I., Philipp H.C., Wieler L.H. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009;75(1):184-192. DOI 10.1128/AEM.01324-08.
Ewers C., de Jong A., Prenger-Berninghoff E., Garch F.E., Leidner U., Tiwari S.K., Semmler T. Genomic diversity and virulence potential of ESBL- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains from healthy food animals across Europe. *Front. Microbiol.* 2021;12:626774. DOI 10.3389/fmicb.2021.626774.

- Huasai S., Chen A., Wang C.-J., Li Y., Tongrige B. Occurrence and characteristics of virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cows in Inner Mongolia, China. *Braz. J. Microbiol.* 2012;43(2):528-534. DOI 10.1590/S1517-83822012000 200013.
- Jiang C., An T., Wang S., Wang G., Si W., Tu Y., Liu Y., Wu J., Liu S., Cai X. Role of the *ehxA* gene from *Escherichia coli* serotype O82 in hemolysis, biofilm formation, and *in vivo* virulence. *Can. J. Microbiol.* 2015;61(5):335-341. DOI 10.1139/cjm-2014-0824.
- Johnson J.R., Russo T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005;295(6-7):383-404. DOI 10.1016/j.ijmm.2005.07.005.
- Johnson T.J., Wannemuehler Y., Doetkott C., Johnson S.J., Rosenberger S.C., Nolan L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(12):3987-3996. DOI 10.1128/JCM.00816-08.
- Lee S., Teng L., DiLorenzo N., Weppelmann T.A., Jeong K.C. Prevalence and molecular characteristics of extended-spectrum and AmpC β -lactamase producing *Escherichia coli* in grazing beef cattle. *Front. Microbiol.* 2020;10:3076. DOI 10.3389/fmicb.2019.03076.
- Madoshi B.P., Kudirkiene E., Mtambo M.M., Muhairwa A.P., Lupindu A.M., Olsen J.E. Characterisation of commensal *Escherichia coli* isolated from apparently healthy cattle and their attendants in Tanzania. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168160. DOI 10.1371/journal.pone.0168160.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatoopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18(3):268-281. DOI 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Manges A.R. *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016;22(2):122-129. DOI 10.1016/j.cmi.2015.11.010.
- Monday S.R., Keys C., Hanson P., Shen Y., Whittam T.S., Feng P. Produce isolates of the *Escherichia coli* Ont:H52 serotype that carry both Shiga toxin 1 and stable toxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(4):3062-3065. DOI 10.1128/AEM.72.4.3062-3065.2006.
- Mora A., Viso S., López C., Alonso M.P., García-Garrote F., Dabhi G., Mamani R., Herrera A., Marzoa J., Blanco M., Blanco J.E., Moulin-Schouleur M., Schouler C., Blanco J. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans. *Vet. Microbiol.* 2013;167(3-4):506-512. DOI 10.1016/j.vetmic.2013.08.007.
- Moulin-Schouleur M., Répérant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 2007;45(10):3366-3376. DOI 10.1128/JCM.00037-07.
- Okello E., Williams D.R., ElAshmawy W.R., Adams J., Pereira R.V., Lehenbauer T.W., Aly S.S. Survey on antimicrobial drug use practices in California preweaned dairy calves. *Front. Vet. Sci.* 2021;8:636670. DOI 10.3389/fvets.2021.636670.
- Oporto B., Oejo M., Alkorta M., Marimón T., Montes M., Hurtado A. Zoonotic approach to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: integrated analysis of virulence and antimicrobial resistance in ruminants and humans. *Epidemiol. Infect.* 2019;147:e164. DOI 10.1017/S0950268819000566.
- Orden J.A., Cid D., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., García S., Martínez S., de la Fuente R. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 2002;93(1):29-35. DOI 10.1046/j.1365-2672.2002.01649.x.
- Pardon B., Smet A., Butaye P., Argudín M.A., Valgaeren B., Catry B., Haesebrouck F., Deprez P. Nosocomial intravascular catheter infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in calves after strain introduction from a commercial herd. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017;64(1):130-136. DOI 10.1111/tbed.12352.
- Pereira R.V., Santos T.M., Bicalho M.L., Caixeta L.S., Machado V.S., Bicalho R.C. Antimicrobial resistance and prevalence of virulence factor genes in fecal *Escherichia coli* of Holstein calves fed milk with and without antimicrobials. *J. Dairy Sci.* 2011;94(9):4556-4565. DOI 10.3168/jds.2011-4337.
- Santos A.C.M., Santos F.F., Silva R.M., Gomes T.A.T. Diversity of hybrid- and hetero-pathogenic *Escherichia coli* and their potential implication in more severe diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10:339. DOI 10.3389/fcimb.2020.00339.
- Sato K., Bartlett P.C., Saeed M.A. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from dairy farms using organic versus conventional production methods. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005;226(4): 589-594. DOI 10.2460/javma.2005.226.589.
- Sato T., Okubo T., Usui M., Yokota S., Izumiyama S., Tamura Y. Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. *PLoS One.* 2014;9(4): e96101. DOI 10.1371/journal.pone.0096101.
- Suojala L., Pohjanvirta T., Simojoki H., Myllyniemi A.L., Pitkala A., Pelkonen S., Pyorala S. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 2010;147(3-4):383-388. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.07.011.
- Tivendale K.A., Logue C.M., Kariyawasam S., Jordan D., Hussein A., Li G., Wannemuehler Y., Nolan L.K. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. *Infect. Immun.* 2010;78(8):3412-3419. DOI 10.1128/IAI.00347-10.
- Vila J., Sáez-López E., Johnson J.R., Römmling U., Dobrindt U., Cantón R., Giske C.G., Naas T., Carattoli A., Martínez-Medina M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016;40(4):437-463. DOI 10.1093/femsre/fuw005.
- Vincent C., Boerlin P., Daignault D., Dozois C.M., Dutil L., Galanakis C., Reid-Smith R.J., Tellier P.P., Tellis P.A., Ziebell K., Manges A.R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16(1):88-95. DOI 10.3201/eid1601.091118.

ORCID ID

V.S. Mihailovskaya orcid.org/0000-0002-4264-8177
I.N. Zhdanova orcid.org/0000-0002-0260-6917
M. Starčić Erjavec orcid.org/0000-0003-0200-573X
M.V. Kuznetsova orcid.org/0000-0003-2448-4823

Благодарности. Работа выполнена при поддержке правительства Пермского края по проекту № С-26/541 и государственному заданию АААА-А19-119112290009-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.03.2022. После доработки 07.05.2022. Принята к публикации 12.05.2022.

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa*

У.М. Немченко¹✉, К.О. Ситникова¹, Н.Л. Белькова¹✉, Е.В. Григорова¹, Н.М. Воропаева¹, М.В. Сухорева²,
Е.С. Сухарева², Е.Д. Савилов^{1,3}

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

² Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница, Иркутск, Россия

³ Иркутская государственная академия последипломного образования – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иркутск, Россия

✉ umnemch@mail.ru; nlbelkova@gmail.com

Аннотация. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) относится к наиболее проблемным патогенам в лечебных учреждениях, что может быть связано со способностью этого микроорганизма существовать в биопленке, которая повышает его устойчивость к антимикробным препаратам, а также распространённость и выживаемость во внешней среде. Цель настоящей работы – оценка чувствительности штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в планктонной форме и форме биопленки, к воздействию антимикробных препаратов. Исследовано 20 штаммов *P. aeruginosa* из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, собранной в течение 2018–2021 гг. Идентификация штаммов проведена с использованием тест-систем для дифференциации грамотрицательных неферментирующих бактерий и подтверждена масс-спектрометрическим анализом и секвенированием гена 16S рРНК. Активность антимикробных препаратов оценивали по степени ингибирования роста клеток бактерий, находящихся в планктонной форме и форме биопленки. Установлено, что все клинические штаммы *P. aeruginosa* были биопленкообразующими, 47.6% относились к слабообразующим, 52.4% – к умереннообразующим. Планктонные клетки и формирующаяся биопленка тестируемых штаммов были устойчивы к карбапенемам. Формирование биопленки в более чем 90% случаев подавляло препараты групп цефалоспоринов и аминогликозидов. Чувствительность к воздействию антимикробных препаратов у штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в сформированной биопленке, была значимо ниже ($p < 0.05$). Карбапенемы и цефалоспорины не воздействовали на зрелые биопленки тестируемых штаммов *P. aeruginosa* более чем в 60% случаев. Только не-бета-лактамы антибиотики (ципрофлоксацин и амикацин) подавляли рост планктонных клеток и разрушали зрелую биопленку. Выявленные различия в действии испытанных препаратов на биопленку штаммов *P. aeruginosa* коррелируют с устойчивостью к целому ряду антибиотиков. Для предупреждения формирования биопленок у больничных штаммов *P. aeruginosa* может быть рекомендовано применение цефтазидима, для воздействия на зрелые биопленки *P. aeruginosa* – антимикробные препараты цiproфлоксацин и амикацин.
Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; биопленкообразование; антимикробные препараты; антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Немченко У.М., Ситникова К.О., Белькова Н.Л., Григорова Е.В., Воропаева Н.М., Сухорева М.В., Сухарева Е.С., Савилов Е.Д. Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(5):495-501. DOI 10.18699/VJGB-22-60

Effects of antimicrobials on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation

U.M. Nemchenko¹✉, K.O. Sitnikova¹, N.L. Belkova¹✉, E.V. Grigorova¹, N.M. Voropaeva¹, M.V. Sukhoreva²,
E.S. Sukhareva², E.D. Savilov^{1,3}

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

² City Ivano-Matreninskaya Children's Clinical Hospital, Irkutsk, Russia

³ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia

✉ umnemch@mail.ru; nlbelkova@gmail.com

Abstract. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most problematic pathogens in medical institutions, which may be due to the ability of this microorganism to exist in a biofilm, which increases its resistance to antimicrobials, as well as its prevalence and survival ability in the external environment. This work aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* strains in planktonic and biofilm forms. We studied 20 strains of *P. aeruginosa* collected during 2018–2021 by specialists from the Laboratory of Microbiome and Microecology of the Scientific Centre for

Family Health and Human Reproduction Problems. The identification of strains was carried out using test systems for differentiating gram-negative non-fermenting bacteria (NEFERMtest 24 Erba Lachema s.r.o., Czech Republic), and confirmed by mass spectrometric analysis and 16S rRNA gene sequencing. Antimicrobial activity was assessed by the degree of inhibition of cell growth in planktonic and biofilm forms (on a flat-bottomed 96-well plastic immunological plate). All clinical isolates of *P. aeruginosa* were biofilm formers, 47.6 % of the isolates were weak biofilm formers, and 52.4 % of the isolates were moderate biofilm formers. Planktonic cells and the forming biofilm of the tested *P. aeruginosa* strains were carbapenems-resistant. Biofilm formation was suppressed in more than 90 % of cases by the agents of the cephalosporin and aminoglycoside groups. Antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* strains in the formed biofilm was significantly lower ($p < 0.05$). Carbapenems and cephalosporins did not affect the mature biofilms of the tested *P. aeruginosa* strains in more than 60 % of cases. Only non-beta-lactam antibiotics (ciprofloxacin and amikacin) suppressed the growth of planktonic cells and destroyed the mature biofilm. The revealed differences in the effect of the tested antimicrobials on the *P. aeruginosa* strains biofilms correlate with resistance to a number of antibiotics. To prevent biofilm formation in the hospital strains of *P. aeruginosa*, the use of ceftazidime may be recommended, and antimicrobials such as ciprofloxacin and amikacin may be used to affect mature biofilms of *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm formation; antimicrobial drugs; antibiotic resistance.

For citation: Nemchenko U.M., Sitnikova K.O., Belkova N.L., Grigorova E.V., Voropaeva N.M., Sukhoreva M.V., Sukhareva E.S., Savilov E.D. Effects of antimicrobials on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):495–501. DOI 10.18699/VJGB-22-60

Введение

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) неизменно занимает ведущее место среди возбудителей внутрибольничных инфекций в РФ и входит в группу бактерий-оппортунистов, объединенных термином ESKAPE (Склеенова и др., 2018). Наличие широкого спектра патогенетических факторов, генетическая пластичность, способность быстро приобретать резистентность к разным группам антибиотиков делает *P. aeruginosa* одним из самых проблемных патогенов в лечебных учреждениях (Эйделъштейн и др., 2019). Основной риск развития синегнойной инфекции приходится на пациентов с ослабленной иммунной системой, ожогами и травмами глаз, а также имеющих внутренние медицинские устройства (Diggle, Whiteley, 2020). Особо опасна синегнойная инфекция у пациентов с муковисцидозом (Kosztolowicz et al., 2020; Scherz et al., 2022).

Лечение инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, осложняется способностью этих бактерий существовать в биопленке, что повышает их устойчивость к антибиотикам, распространенность и выживаемость (de Abreu et al., 2014; Olivares et al., 2020). Показано, что уничтожение бактериальных биопленок, образующихся в выделяемом больными муковисцидозом секрете, является серьезной проблемой, поскольку диффузия антибиотиков в структуры биопленок слабая, а их антибактериальная активность может стимулировать лекарственную устойчивость (Kosztolowicz et al., 2020). Классические методы определения чувствительности к антибиотикам (определение минимальной подавляющей концентрации и диско-диффузионный метод) применяются на неадгезивных бактериях. Результаты, полученные с помощью этих методов, не могут предсказать терапевтический успех соответствующих антибиотиков против биопленок (Olivares et al., 2020). В настоящее время не существует руководств, помогающих клиницистам лечить биопленочные инфекции, что обосновывает актуальность разработки рутинных лабораторных методов определения чувствительности биопленочных бактерий к антибиотикам (Olivares et al., 2020).

Спектр антисинегнойных антибиотиков, к которым оценивается чувствительность в условиях *in vitro*, по мнению экспертов Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) включает пенициллины, группу цефалоспоринов, карбапенемы, монобактамы, фторхинолоны, аминогликозиды и полимиксины¹. В связи с этим мы изучили влияние на рост планктонных клеток, формирующуюся и зрелую биопленку *P. aeruginosa* представителей названных выше групп антимикробных препаратов (АМП): цефтазидима, цефепима, имипенема, меропенема, цiproфлоксацина и амикацина.

Цель исследования – оценка чувствительности штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в планктонной форме и форме биопленки, к воздействию антимикробных препаратов.

Материалы и методы

Объектами исследования были 20 штаммов *P. aeruginosa* с подтвержденной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, собранной в течение 2018–2021 гг. Типовой штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Национальный биоресурсный центр Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва) использовали в качестве контроля.

Больничные штаммы были изолированы от пациентов из двух лечебных учреждений г. Иркутска по принципу «один пациент – один изолят». Восемь культур было получено из Иркутской государственной областной детской клинической больницы (Носкова и др., 2020), 12 культур – из Городской Ивано-Матренинской детской клинической больницы. Культуры получены от пациентов с различными видами заболеваний (сепсис, острый гематогенный

¹ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Электронный ресурс]. Clinical breakpoints – breakpoints and guidance. URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (дата обращения: 15.10.2021).

остеомиелит, перитонит, пневмония и др.) и выделены из ротоглотки, ликвора, раны, эндотрахеальных трубок, трахеостомы, центрального венозного катетера (всего 14 культур). Отдельную группу составили культуры, выделенные из мокроты пациентов с таким генетическим заболеванием, как муковисцидоз (6 культур).

Идентификация штаммов *P. aeruginosa*. Первичная дифференциация штаммов *P. aeruginosa* проведена по морфологии колоний, пигменту на кровяном агаре, окрашиванию по Граму. Биохимическую идентификацию отобранных культур осуществляли с применением тест-систем для дифференциации грамотрицательных неферментирующих бактерий NEFERMtest 24 (Erba Lachema s.r.o., Чешская Республика) и подтверждали MALDI-TOF прямого белкового профилирования неспорообразующих микроорганизмов. Масс-спектрометрический анализ выполняли на приборе ultraflExtreme (Bruker Daltonics, Германия). Дополнительно культуры идентифицировали по фрагменту рибосомного оперона, содержащему V1–V4 переменные участки гена 16S рРНК. Полноразмерные фрагменты гена 16S рРНК штаммов *P. aeruginosa* зарегистрированы в международной базе данных GenBank под номерами OL616031–OL616034.

Для оценки влияния АМП на формирование биопленки и разрушение сформированных биопленок использовали антибиотики следующих групп: цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды, фторхинолоны, в виде стандартных дисков индикаторных картонных с противомикробными лекарственными средствами ДИ-ПЛС-50-01 (ООО «НИЦФ» Россия), HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия).

Определение способности к биопленкообразованию и устойчивости биопленок к воздействию АМП с использованием 96-луночных пластиковых планшетов. Для анализа брали суточную культуру. Плотность инокулюма доводили в мясоептонном бульоне (МПБ) до 10^6 колониеобразующих Ед/мл. Подготовку штаммов, измерение оптической плотности культуры, окраску биопленок, определение интенсивности биопленкообразования путем измерения оптической плотности экстрактов генцианвиолет/этанол, расчет коэффициента биопленкообразования (КБП) проводили согласно описанным ранее методикам (Немченко и др., 2020; Grigorova et al., 2021).

Оценка способности АМП воздействовать на рост планктонных клеток и формирование биопленок. Для определения способности АМП воздействовать на планктонные клетки и формирующуюся биопленку в планшет одновременно с суточной культурой вносили по одному диску АМП с требуемой концентрацией антибиотика: цефтазидим – 10 мкг, цефепим – 30 мкг, имипенем – 10 мкг, меропенем – 10 мкг, ципрофлоксацин – 5 мкг, амикацин – 30 мкг. Контролем служил стерильный МПБ. Через 30 мин диски удаляли (Тапальский, Бильский, 2018), планшеты культивировали в термостате в течение 24 ч, далее эксперименты вели, как было описано ранее (Немченко и др., 2020; Grigorova et al., 2021).

Оценка способности АМП разрушать зрелые биопленки. Для определения способности АМП разрушать зрелую биопленку из планшета с исследуемыми культурами через 24 ч инкубации удаляли планктонные клетки,

трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой и вносили в каждую лунку, включая контрольные, по 150 мкл стерильного МПБ и по одному диску АМП. Через 30 мин диски удаляли. Планшеты инкубировали еще 24 ч. Далее порядок действий был аналогичен ранее изложенному (Немченко и др., 2020; Grigorova et al., 2021).

Учет результатов эксперимента. Коэффициент биопленкообразования рассчитывали после измерения оптической плотности этанольного экстракта окрашенных лунок во всех планшетах как отношение оптическая плотность экстракта опыт/оптическая плотность экстракта контроль. При полученных значениях КБП менее 2.0 штаммы относили к слабообразующим биопленку, при значениях 2.0–3.9 – к умереннообразующим, выше 3.9 – к высокообразующим биопленку (Немченко и др., 2020; Grigorova et al., 2021).

Коэффициент влияния АМП на формирующуюся и зрелую биопленку рассчитывали по формуле

$$\text{ОП БП}_{\text{форм}}/\text{ОП БП}_{\text{без АМП}} \text{ или } \text{ОП БП}_{\text{зрел}}/\text{ОП БП}_{\text{без АМП}}$$

где ОП БП_{форм} или ОП БП_{зрел} – оптическая плотность этанольного экстракта биопленки, подвергшейся влиянию АМП, ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность этанольного экстракта биопленок культур, не подвергавшихся влиянию АМП. 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.

Прирост планктонных клеток в лунках планшета определяли как отношение оптической плотности суспензии планктонных клеток бактерий через 24 ч культивирования к исходной плотности, результат интерпретировали, как было описано ранее (Немченко и др., 2020; Grigorova et al., 2021).

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ MS Excel 2007 for Windows 7. Для оценки значимости различий между двумя группами по уровню какого-либо признака применяли непараметрические критерии: χ^2 , *U*-критерий Манна–Уитни. Для качественных переменных рассчитывались абсолютные и относительные (процентные) величины. Уровень значимости при проверке статистических гипотез (*p*) принят равным 0.05.

Результаты

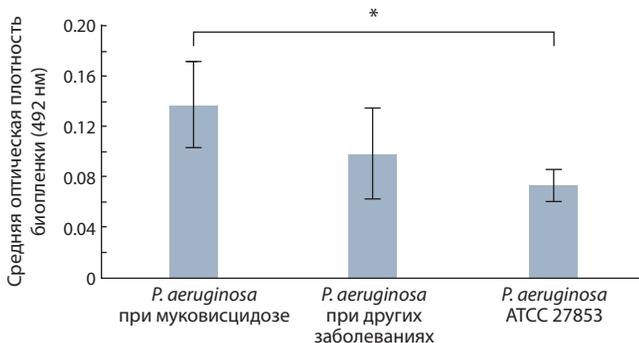
Установлено, что в лабораторных условиях без воздействия АМП планктонные клетки *P. aeruginosa* обладают значительной скоростью роста (табл. 1). Плотность микробных клеток увеличилась за 24 ч культивирования более чем в 10 раз по сравнению с начальной ($U_{\text{эмп}} = 0$, различия, значимые между исходной плотностью и плотностью через 24 ч, критерий Манна–Уитни).

Оптическая плотность биопленки культур *P. aeruginosa*, выделенных из мокроты при таком тяжелом генетически обусловленном заболевании, как муковисцидоз, была значительно больше, чем типового штамма ($p < 0.01$) и культуры, изолированных при других заболеваниях (см. рисунок). Аналогичная закономерность отмечается и при сравнении КБП. В среднем КБП МВ *P. aeruginosa* 2.79 ± 0.78 ; *P. aeruginosa* при других заболеваниях 2.01 ± 0.69 ; *P. aeruginosa* ATCC 27853 – 1.56.

Таблица 1. Характеристика тестируемых штаммов *P. aeruginosa* по скорости роста и интенсивности биопленкообразования

Показатель	Градация показателя	Штаммы, %	
Интенсивность прироста	Отсутствует	0	
	Слабая	0	
	Значительная	100	
Биопленкообразование	Отсутствует	0	
	Слабое	47.6	
	Умеренное	52.4	
Параметр	<i>P. aeruginosa</i> при муковисцидозе	<i>P. aeruginosa</i> при других заболеваниях	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Среднее значение оптической плотности биопленки ¹	0.137	0.098	0.073
Среднее значение оптической плотности МПБ (контроль)	0.047	0.047	0.047
Среднее значение КБП	2.79	2.01	1.56

Примечание. ¹ Разница значима между оптической плотностью экстрактов генцианвиолет/этанол культур при муковисцидозе и оптической плотностью экстрактов генцианвиолет/этанол *P. aeruginosa* ATCC 27853, $U_{эмп} = 1$ критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$. МПБ – мясо-пептонный бульон; КБП – коэффициент биопленкообразования.



Среднее значение оптической плотности биопленки тестируемых штаммов *P. aeruginosa*.

* Разница значима между оптической плотностью биопленки культур при муковисцидозе и оптической плотностью биопленки *P. aeruginosa* ATCC 27853, $U_{эмп} = 1$ критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$.

Оценка способности к биопленкообразованию по количеству красителя, связавшегося с биопленкой, показала, что исследуемые штаммы, в том числе типовой штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, в 47.6 % были слабообразующими биопленку, в 52.4 % случаев – умереннообразующими биопленку (см. табл. 1).

Сравнение оптической плотности культур, рост которых происходил без воздействия и под воздействием АМП, выявило, что планктонные клетки были устойчивы к АМП имипенему (5 % чувствительных культур, $U_{эмп} = 46$) и меропенему (5 % чувствительных культур, $U_{эмп} = 64.5$; есть разница между начальной и плотностью через 24 ч, критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$). Остальные препараты подавляли рост планктонных клеток, наиболее эффективными были амикацин (60 % чувствительных культур, $U_{эмп} = 180.5$) и цiproфлоксацин (50 % чувствительных

культур, $U_{эмп} = 191.5$), цефепим воздействовал на 40.0 % культур ($U_{эмп} = 191.5$), цефтазидим в 35 % случаев подавлял рост культур *P. aeruginosa* ($U_{эмп} = 179.0$) (нет разницы между начальной и плотностью через 24 ч, критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$).

Изучение способности АМП воздействовать на формирующиеся и разрушать зрелые биопленки

Способность АМП воздействовать на формирование биопленок культурами *P. aeruginosa* оценивали по соотношению оптической плотности биопленок, подвергшихся влиянию АМП, к оптической плотности биопленок без воздействия АМП.

Проведенные исследования показали, что не все АМП препятствовали образованию биопленки (табл. 2). Цiproфлоксацин не влиял на биопленкообразование в 23.8 % случаев, имипенем и меропенем – в 33.3 и 38.1 % случаев соответственно; наиболее эффективно подавляли образование биопленок цефтазидим, цефепим и амикацин. Значимые различия установлены только для цефтазидима, который наиболее действенно подавлял образование биопленок по сравнению с имипенемом ($\chi^2 = 5.62$) и меропенемом ($\chi^2 = 7.03$) ($p < 0.05$).

Чувствительность к воздействию АМП клеток *P. aeruginosa*, находящихся в зрелой биопленке, была ниже, чем у формирующихся биопленок (критерий Манна–Уитни, разница значима между оптической плотностью формирующейся биопленки и зрелых биопленок, $p < 0.05$). АМП цефтазидим, цефепим, имипенем и меропенем слабо воздействовали или не воздействовали на биопленки *P. aeruginosa*, соотношение БП_{зрел}/БП_{без АМП} было от 0.9 и выше в более 60 % случаев. На сформированную биопленку воздействовали только такие не-бета-лактамы антибиотиками, как амикацин и цiproфлоксацин (табл. 3). Сравнение действия АМП между собой показало, что

Таблица 2. Способность АМП воздействовать на формирование биопленки тестируемых штаммов *P. aeruginosa* (абсолютное значение/%)

Антимикробный препарат	Соотношение ОП БП _{форм} /ОП БП _{без АМП}		
	< 0.9	от 0.9 до 1.0	от 1.0 и выше
Цефтазидим ¹	19/95	1/5	–
Цефепим ²	18/90	–	2/10
Амикацин ²	18/90	–	2/10
Ципрофлоксацин ²	15/75	–	5/25
Имипенем ²	13/65	2/10	5/25
Меропенем ²	12/60	2/10	6/30

¹ Цефтазидим воздействует на биопленкообразование при сравнении с имипенемом и меропенемом, $p < 0.05$; ² нет разницы при сравнении воздействия между другими АМП, $p > 0.05$. ОП БП_{форм} – оптическая плотность формирующейся биопленки под воздействием АМП/ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность биопленки без воздействия АМП; АМП – антимикробные препараты.

амикацин был наиболее эффективен, чем цефтазидим ($\chi^2 = 5.01$) и меропенем ($\chi^2 = 10.98$), ципрофлоксацин эффективнее, чем меропенем ($\chi^2 = 7.62$).

Коэффициент биопленкообразования штаммов *P. aeruginosa*, находящиеся в сформированной биопленке, был значимо выше, чем КБП культур, подвергшихся воздействию АМП на этапе формирования биопленки, что также подтверждает устойчивость зрелой биопленки. Коэффициент биопленкообразования для цефтазидима_{форм/зрел} $U_{эмп} = 48.5$; цефепима_{форм/зрел} $U_{эмп} = 58$; имипенема_{форм/зрел} $U_{эмп} = 94$; меропенема_{форм/зрел} $U_{эмп} = 79$; ципрофлоксацина_{форм/зрел} $U_{эмп} = 97$; амикацина_{форм/зрел} $U_{эмп} = 50$. Есть разница между значениями КБП формирующейся и КБП зрелой биопленки, критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$.

Обсуждение

В эксперименте показано, что не все АМП подавляли рост планктонных клеток клинических изолятов *P. aeruginosa*. Резистентность к антисинегнойным цефалоспорином (цефтазидиму и цефепиму) проявляли соответственно 65 и 60 % тестируемых штаммов. Резистентность к карбапенемам (имипенему и меропенему) была отмечена практически у всех изолятов. К не-бета-лактамам антибиотикам (амикацину и ципрофлоксацину) были устойчивы 40 и 50 % штаммов соответственно. Полученные данные согласуются как с нашими предыдущими работами (Носкова и др., 2020), так и с проведенным многоцентровым эпидемиологическим исследованием антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций («МАРАФОН» 2015–2016 гг.), в котором отмечался рост резистентности внутрибольничных штаммов *P. aeruginosa* к большинству АМП, включая карбапенемы (Эйдельштейн и др., 2019).

Исследуемые штаммы, особенно выделенные от больных с муковисцидозом, были биопленкообразующими (см. табл. 1). Это послужило нам основанием для оценки эффективности воздействия АМП на формирующуюся биопленку нозокомиальных патогенов. В ходе экспе-

Таблица 3. Способность различных АМП воздействовать на зрелую биопленку тестируемых штаммов *P. aeruginosa* (абсолютное значение/%)

Антимикробный препарат	Соотношение ОП БП _{зрел} /ОП БП _{без АМП}		
	< 0.9	от 0.9 до 1.0	от 1.0 и выше
Амикацин ¹	12/60	3/15	5/25
Ципрофлоксацин ²	10/50	–	10/50
Цефтазидим	5/25	3/15	12/60
Цефепим	8/40	–	12/60
Имипенем	6/30	–	14/70
Меропенем	2/10	4/20	14/70

¹ Амикацин разрушает зрелую биопленку при сравнении с цефтазидимом ($p = 0.02$) и меропенемом ($p < 0.001$); ² ципрофлоксацин разрушает зрелую биопленку при сравнении с меропенемом ($p < 0.05$). ОП БП_{зрел} – оптическая плотность зрелой биопленки под воздействием АМП/ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность биопленки без воздействия АМП; АМП – антимикробные препараты.

римента установлено, что по сравнению с другими антибиотиками самым эффективным препаратом, препятствующим биопленкообразованию, был цефтазидим (см. табл. 2).

Как свидетельствуют последние исследования, кроме классических механизмов устойчивости, бактерии способны выдерживать воздействие высоких концентраций антибиотика, проявляя так называемую толерантность (Brauner et al., 2016; Yan, Bassler, 2019). Толерантные бактерии растут медленнее, чем их нетолерантные аналоги, и могут избежать гибели при лечении антибиотиками (Brauner et al., 2016). Другую форму толерантности, проявляющуюся не в результате наследственных мутаций, а, скорее, в ходе фенотипической дифференциации, принято называть персистенцией. Зависимое от времени уничтожение бактериальной популяции антибиотиками показывает, что активно растущие клетки погибают первыми, тогда как клетки-персистеры гибнут во второй фазе с гораздо меньшей скоростью. Именно эта подгруппа микроорганизмов выживает во время лечения антибиотиками и восстанавливается после их отмены (Balaban et al., 2004).

Предполагается, что способность биопленок содержать толерантные и персистирующие клетки лежит в основе трудностей, возникающих при устранении биопленок (Lewis, 2012). Вероятно, повышенная толерантность к антибиотикам возникает из-за измененной физиологии клеток биопленок. Считается также, что клетки внутри биопленок могут находиться в стационарной фазе, когда проникновение питательных веществ и кислорода ограничено из-за потребления периферически расположенными клетками (Yan, Bassler, 2019). Наличие клеток-персистеров может быть опасно для определенных групп пациентов, например с муковисцидозом, когда мутанты с высокой персистирующей способностью выделяются после длительного лечения антибиотиками (Lewis, 2012).

Представленные исследования выявили, что чувствительность к воздействию АМП клеток, находящихся в зрелых биопленках, была значимо ниже; тестируемые антибиотики в основном не разрушали биопленки культур *P. aeruginosa*, ББП у культур в зрелых биопленках был выше, чем у культур, на которые АМП действовал во время формирования биопленки ($p < 0.01$).

Из всех протестированных АМП только не-бета-лактамы антибиотики (ципрофлоксацин и амикацин) подавляли рост планктонных клеток и разрушали зрелую биопленку, что может быть связано с механизмом действия разных классов антибиотиков. Находящиеся в биопленке клетки снижают скорость деления клеток, вследствие чего они менее чувствительны к воздействующим на клеточную стенку бета-лактамам антибиотикам, тогда как действие цiproфлоксацина и амикацина не требует активно делящихся клеток, поскольку нацелено на транскрипционные и трансляционные процессы (Сидоренко и др., 2013; Thieme et al., 2021).

Самым эффективным подходом для предотвращения образования биопленки будет ингибирование адгезивной способности клеток (Olivares et al., 2020). Так, в исследовании (Otan et al., 2018) показано, что субингибирующие минимальные подавляющие концентрации цефтазидима уменьшают массу биопленки, подавляют подвижность и экспрессию генов, участвующих в бактериальной адгезии и продукции матрикса *P. aeruginosa* PAO1. Ранее S. Roudashti с коллегами (2017) заметили влияние цефалоспоринов на системы QS *P. aeruginosa*, обеспечивающие подвижность и образование биопленок у этих микроорганизмов. В нашей работе цефтазидим также проявлял наибольшую антибиопленочную активность по сравнению с другими АМП. Однако механизм устойчивости биопленок к АМП сложен, многофакторен и противоречив. Подтверждением высказанного положения служат многочисленные исследования, демонстрирующие, что низкие дозы противомикробных препаратов в очаге инфекции могут увеличивать риск мутагенеза и инициируют образование биопленок (Kaplan, 2011; Ciofu et al., 2015; Olivares et al., 2020).

Заключение

Таким образом, изучение влияния АМП групп цефалоспоринов, карбапенемов, фторхинолонов и аминогликозидов на биопленки тестируемых больничных штаммов *P. aeruginosa* показало, что антисинегнойные препараты в основном препятствовали образованию биопленки, но не разрушали уже сформированную биопленку. Выявленные значительные различия в действии испытанных АМП как на зрелую биопленку штаммов *P. aeruginosa*, так и на процесс ее формирования в определенной степени коррелируют с устойчивостью данного микроорганизма к целому ряду антибиотиков (Эйдельштейн и др., 2019; Аджиева и др., 2021). Для выяснения задействованных механизмов необходимы дополнительные исследования, направленные на обнаружение толерантных и персистирующих клеток, что позволит оптимизировать общее использование противомикробных препаратов при лечении инфекций, связанных с биопленками (Yan, Bassler, 2019). Для предупреждения формирования биопленок

у больничных штаммов *P. aeruginosa* может быть рекомендовано применение цефтазидима, для воздействия на зрелые биопленки *P. aeruginosa* – АМП амикацина и цiproфлоксацина.

Список литературы / References

- Аджиева А.А., Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г. Влияние антибиотиков на образование биопленки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro*. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(1):59-64. DOI 10.36233/0372-9311-64.
- [Adzhieva A.A., Danilova T.A., Danilina G.A., Shevlyagina N.V., Minko A.G., Zhukhovitsky V.G. Influence of antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* *in vitro*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(1):59-64. DOI 10.36233/0372-9311-64. (in Russian)]
- Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., Чemezova Н.Н., Савилов Е.Д. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65(10):652-658. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658.
- [Nemchenko U.M., Kungurtseva E.A., Grigороva E.V., Belkova N.L., Markova Y.A., Noskova O.A., Chemezova N.N., Savilov E.D. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* = *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020;65(10):652-658. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658. (in Russian)]
- Носкова О.А., Савилов Е.Д., Чemezova Н.Н., Белькова Н.Л. Антибиотикорезистентность возбудителей генерализованных гнойно-септических инфекций у детей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020;19(6):56-61. DOI 10.31631/2073-3046-2020-19-6-56-61.
- [Noskova O.A., Savilov E.D., Chemezova N.N., Belkova N.L. Antibiotic resistance of pathogens of generalized purulent septic infections in children. *Epidemiologiya i Vaksinooprofilaktika* = *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(6):56-61. DOI 10.31631/2073-3046-2020-19-6-56-61. (in Russian)]
- Сидоренко С.В., Партина И.В., Агеевец В.А. Имипенем: 30 лет терапии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013;58(5-6):55-61.
- [Sidorenko S.V., Partina I.V., Ageevets V.A. Imipenem: 30-year experience in therapy. *Antibiotiki i Khimioterapiya* = *Antibiotics and Chemotherapy*. 2013;58(5-6):55-61. (in Russian)]
- Склеенова Е.Ю., Азизов И.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;3:164-171. DOI 10.36488/cmac.2018.3.164-171.
- [Skleenova E.Yu., Azizov I.S., Shek E.A., Edelstein M.V., Kozlov R.S., Dekhnic A.V. *Pseudomonas aeruginosa*: the history of one of the most successful nosocomial pathogens in Russian hospitals. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;3:164-171. DOI 10.36488/cmac.2018.3.164-171. (in Russian)]
- Тапальский Д.В., Бильский И.А. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;1:62-67. DOI 10.36488/cmac.2018.1.62-67.
- [Tapalskiy D.V., Bilskiy I.A. Antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution method: widely available modification. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;1:62-67. DOI 10.36488/cmac.2018.1.62-67. (in Russian)]

- Эйделштейн М.В., Шек Е.А., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., ... Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):160-170. DOI 10.36488/смас.2019.2.160-170.
- [Edelstein M.V., Shek E.A., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., ... Zvonaryova O.V., Kornilova P.A., Kryanga V.G., Portnyagina U.S., Shamaeva S.Kh. Antimicrobial resistance, carbapenemase production and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(2):160-170. DOI 10.36488/смас.2019.2.160-170. (in Russian)]
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305(5690):1622-1625. DOI 10.1126/science.1099390.
- Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(5):320-330. DOI 10.1038/nrmicro.2016.34.
- Ciofu O., Tolker-Nielsen T., Jensen P.O., Wang H., Hoiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;85:7-23. DOI 10.1016/j.addr.2014.11.017.
- de Abreu P.M., Farias P.G., Paiva G.S., Almeida A.M., Morais P.V. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol.* 2014;14:118. DOI 10.1186/1471-2180-14-118.
- Diggle S.P., Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*. 2020;166(1):30-33. DOI 10.1099/mic.0.000860.
- Grigorova E.V., Nemchenko U.M., Voropaeva N.M., Bel'kova N.L., Noskova O.A., Savilov E.D. Effect of disinfectants with different active ingredients on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;171(6):745-749. DOI 10.1007/s10517-021-05308-y.
- Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs*. 2011;34(9):737-751. DOI 10.5301/ijao.5000027.
- Kosztolowicz T., Metzler R., Waşik S., Arabski M. Modelling experimentally measured of ciprofloxacin antibiotic diffusion in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formed in artificial sputum medium. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243003. DOI 10.1371/journal.pone.0243003.
- Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. In: Coates A. (Ed.). *Antibiotic Resistance. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin; Heidelberg: Springer, 2012; 211:121-133. DOI 10.1007/978-3-642-28951-4_8.
- Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Bernardi T., Jehl F. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front Microbiol.* 2020;10:2894. DOI 10.3389/fmicb.2019.02894.
- Otani S., Hiramatsu K., Hashinaga K., Komiya K., Umeki K., Kishi K., Kadota J.-I. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Infect. Chemother.* 2018;24(6):428-433. DOI 10.1016/j.jiac.2018.01.007.
- Roudashti S., Zeighami H., Mirshahabi H., Bahari S., Soltani A., Haghi F. Synergistic activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftazidime and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing related genes and virulence traits. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017;33(3):50. DOI 10.1007/s11274-016-2195-0.
- Scherz V., Caruana G., Taffé P., Brouillet R., Bertelli C., Jatton K., Asner S.A. Unexpected associations between respiratory viruses and bacteria with Pulmonary Function Testing in children suffering from Cystic Fibrosis (MUCOVIB study). *J. Cyst. Fibros.* 2022;21(2):e158-e164. DOI 10.1016/j.jcf.2021.10.001.
- Thieme L., Hartung A., Tramm K., Graf J., Spott R., Makarewicz O., Pletz M.W. Adaptation of the Start-Growth-Time method for high-throughput biofilm quantification. *Front. Microbiol.* 2021;12:631248. DOI 10.3389/fmicb.2021.631248.
- Yan J., Bassler B.L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe*. 2019;26(1):15-21. DOI 10.1016/j.chom.2019.06.002.

ORCID ID

U.M. Nemchenko orcid.org/0000-0002-7656-342X
K.O. Sitnikova orcid.org/0000-0001-7717-906X
N.L. Belkova orcid.org/0000-0001-9720-068X
E.V. Grigorova orcid.org/0000-0001-6588-2591
N.M. Voropaeva orcid.org/0000-0001-7026-2522
E.D. Savilov orcid.org/0000-0002-9217-6876

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.03.2022. После доработки 30.06.2022. Принята к публикации 30.06.2022.

Прием статей через электронную редакцию на сайте <http://vavilov.elpub.ru/index.php/jour>
Предварительно нужно зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи.

«Вавиловский журнал генетики и селекции»/“Vavilov Journal of Genetics and Breeding”
до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС»/
“The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists”.

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, Российский индекс научного цитирования, ВИНТИ, базы данных Emerging Sources Citation Index (Web of Science), Zoological Record (Web of Science), Scopus, PubMed Central, Ebsco, DOAJ, Ulrich’s Periodicals Directory, Google Scholar, Russian Science Citation Index на платформе Web of Science, каталог научных ресурсов открытого доступа ROAD.

Открытый доступ к полным текстам:
на сайте ИЦиГ СО РАН – bionet.nsc.ru/vogis/
платформе Elpub – vavilov.elpub.ru/index.php/jour
платформе Научной электронной библиотеки – elibrary.ru/title_about.asp?id=32440
PubMed Central, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3805/>

Подписку на «Вавиловский журнал генетики и селекции» можно оформить в любом почтовом отделении России. Индекс издания 42153 по каталогу «Пресса России».

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

✉ e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Издатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Адрес редакции: проспект Академика Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090.

Секретарь по организационным вопросам С.В. Зубова. Тел.: (383)3634977.

Издание подготовлено информационно-издательским отделом ИЦиГ СО РАН. Тел.: (383)3634963*5218.

Начальник отдела: Т.Ф. Чалкова. Редакторы: В.Д. Ахметова, И.Ю. Ануфриева. Дизайн: А.В. Харкевич.

Компьютерная графика и верстка: Т.Б. Коняхина, О.Н. Савватеева.

Подписано в печать 22.08.2022. Выход в свет 31.08.2022. Формат 60 × 84 1/8. Усл. печ. л. 10.93.

Уч.-изд. л. 12.9. Тираж 150 экз. (1-й завод 1–45 экз.) Заказ № 263. Цена свободная.

Отпечатано в Сибирском отделении РАН, Морской проспект, 2, Новосибирск, 630090.

