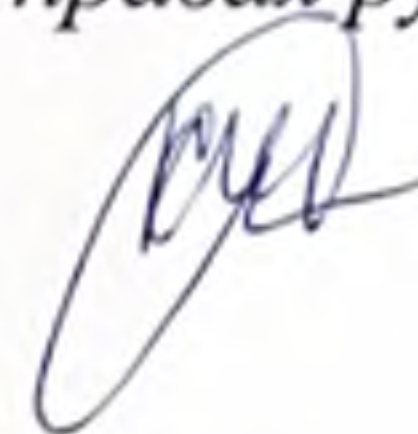


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи



Шарафутдинова Карина Ильшатовна

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ
ЧИСЛЕННОСТИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Руководитель:
д.б.н., профессор кафедры
фундаментальной и прикладной
микробиологии



Ал.Х.Баймиев

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	6
1.1. Клубеньковые бактерии	6
1.2. Регуляция численности бактерий в ризосфере и почве	18
1.3. Антибактериальные соединения микроорганизмов	23
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Объекты исследования	31
2.2. Методы исследования	33
2.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования клубеньковых бактерий.	33
2.2.2. Оживление штаммов клубеньковых бактерий после криохранения.	33
2.2.3. Получение бактериального газона.	34
2.2.4. Определение механизма антибактериальной активности.	34
2.2.5. Скрининг штаммов на синтез антибактериальных соединений на газоне ризобий.	35
2.2.6. Скрининг штаммов на синтез антибактериальных соединений на газоне клеток <i>E. coli</i> Δ TolC, трансформированных векторной конструкцией pDualrep2.....	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	37
3.1. Подбор штаммов и условий культивирования для бактериального газона.	37

3.2. Скрининг коллекционных штаммов клубеньковых бактерий на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий.	39
3.3. Скрининг штаммов, обладающих антибактериальной активностью, на способность подавлять рост штамма <i>E. coli</i> ΔTolC, трансформированного векторной конструкцией pDualrep2.	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
ВЫВОДЫ.....	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ.....	50

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых процессов, от которых зависит биологическая продуктивность на Земле, является фиксация атмосферного азота микроорганизмами. Выделяют две группы микроорганизмов, которые фиксируют атмосферный азот. Одна из них существует в симбиозе с высшими растениями и образует клубеньки на корнях. К ним относятся клубеньковые бактерии.

Клубеньковые бактерии специфичны, поэтому некоторые бактерии встречаются только в корнях клевера, но не могут поражать корни гороха, люцерны, люпина и других бобовых культур. Группы бактерий, образующие клубеньки на корнях люпинов и серраделей, не заражают корни клевера, гороха и другие. Клубеньковые бактерии представляют собой группу почвенных микроорганизмов, которые преобразовывают инертный азот в усвояемую форму (аммиак) в специализированных структурах – клубеньках, формируемых на корнях бобового растения – хозяина. Таким бактериям-микросимбионтам для успешной колонизации и инфицирования корней растения-хозяина необходимо противостоять в конкурентной борьбе другим близкородственным ризобиям и посторонней микрофлоре ризосферы. Для этого они выделяют различные вещества, которые подавляют рост других микроорганизмов. Известно, что некоторые ризобии синтезируют бактериоцины – это соединения различной природы, специфично подавляющих рост гомологичных ризобий. Бактериоцины обладают узким спектром активности и имеют белковую природу, что и отличает их от антибиотиков. Бактериоцины можно определить как белковые токсины, синтезируемые на рибосомах, продуцируемые грамположительными и грамотрицательными бактериями, которые ингибируют рост близкородственных видов и штаммов бактерий. Они являются одним из видов оружия против микроорганизмов из-за своих разнообразных структур, функций, природных ресурсов и специфических свойств, таких как термостойкость. В последние годы были

получены бактериоцины и протестированы на пригодность к использованию в пищевых технологиях для продления срока хранения продуктов, лечения рака, также улучшения здоровья человека. Поэтому бактериоцины имеют потенциал замены антибиотиков в лечении патогенов с множественной лекарственной устойчивостью в будущем. Среди бактериоцинов к настоящему времени хорошо описаны два пептида: трифолицин и фазолицин, которые работают как узкоспецифичные антибиотики. Фазолицин относится к рибосомно синтезированным и посттрансляционно-модифицированным пептидам (RiPP). Фазолицин обладает антибактериальной активностью и может ингибировать рост различных бактерий из родов *Rhizobium* и *Sinorhizobium*. На данный момент ризобии являются уникальным объектом для исследования регуляции численности бактерий и источником для поиска новых антибактериальных соединений, потенциально применимых для разработки на их основе антибиотиков для нужд сельского хозяйства и медицины.

Цель

Поиск и оценка распространенности среди клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum* штаммов, синтезирующих вещества, подавляющие рост близкородственных бактерий.

Задачи

- 1) Отработать методику культивирования ризобий для определения оптимальных условий синтеза антибактериальных соединений.
- 2) Провести скрининг штаммов из коллекции «Симбионт» на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий.
- 3) Провести скрининг штаммов, обладающих антибактериальной активностью, на способность подавлять рост штамма *E. coli*, трансформированного векторной конструкцией pDualrep2. При наличии подавления роста определить механизм его действия.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Клубеньковые бактерии

Клубеньковые бактерии (ризобии) – большая и генетически неоднородная группа грамотрицательных почвенных микроорганизмов, способных вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми и фиксировать атмосферный азот [2]. Клубеньковые бактерии отличаются удивительным разнообразием форм – полиморфность. Представляют собой от короткого до среднего размера палочки, подвижные, аэробные микроорганизмы. Молодые бактерии в чистой культуре на среде обычно имеют палочковидную форму, размер палочек около 0,5-0,9 x 1,2-3,0 мкм, подвижны, размножаются делением. С возрастом палочковидные клетки могут перейти к почкованию. Для большинства клубеньковых бактерий оптимальный pH среды находится в пределах 6,5-7,5. Специфические азотфиксирующие органы – корневые клубеньки, которые образуются при взаимодействии бобовых растений с бактериями [20]. Отношение этих бактерий к растениям определяется симбиотическими (*sym*) генами: 1) *nod/nol/nos*, активируют рост клубеньков; 2) *nif/fix*, контролируют симбиотическую азотфиксацию [19]. В основном геном ризобий состоит из хромосомы и нескольких плазмид. Гены, которые связаны с симбиотическим образованием, обычно располагаются в одной из плазмид (симбиотическая плазида или *pSym*) или в хромосоме в виде симбиотических островков. В дополнение к *pSym* другие части генома ризобий, особенно несимбиотические плазмиды, также кодируют дополнительные факторы, такие как белки адгезии и поверхностные полисахариды, которые влияют на развитие конкурентоспособности и эффективного симбиоза [3].

Симбиоз *Rhizobium* и бобовых обеспечивает 50% из 175 миллионов тонн биологической фиксации азота во всем мире. Инокуляция бобовых растений ризобиями при посеве является одним из важных экологических

методов, который используется для улучшения фиксации азота. В дополнение к улучшению образования клубеньков и азотфиксации, инокуляция семян ризобиями стимулирует выработку растительных гормонов, сидерофоров, HCN (цианистого водорода), а также микробного разнообразия и структуры, тем самым усиливая рост растений. Инокуляция ризобиями *Rhizobium leguminosarum* не только улучшала солюбилизацию фосфатов, но также улучшала поглощение фосфора, азота и содержание железа в салате и моркови [46]. Ризобии могут влиять на рост растений с помощью двух механизмов: прямым и косвенным. Прямое действие ризосферных бактерий связано с усилением усвоения растениями питательных веществ, синтезом растительных гормонов, сидерофоров и ферментов, снижением уровня этилена. Ризосфера богата бактериями, стимулирующими поглощение питательных веществ корнями растений, представленными такими бактериями *Azospirillum*, *Bacillus*, *Rhizobium*. Косвенные полезные эффекты этих бактерий вызывают подавление болезней и повышение устойчивости растений к стрессорам [9].

Большинство бактерий, которые фиксируют азот в корневых клубеньках бобовых относятся к классу *α -proteobacteria* и относятся к родам *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Phyllobacterium*, *Mesorhizobium*, *Devosia*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Microvirga*. Установлено, что ризобиальные бактерии – это не единственные обитатели корневых клубеньков бобовых растений. В своих исследованиях Бейеринк впервые выделил штаммы *Bacillus* из клубеньков растений [32]. Взаимодействие с клубеньковыми бактериями играет очень важную роль в жизни бобовых растений. Особенность этих взаимодействий заключается в том, что у симбиотических партнеров появляются новые характеристики, которых нет у свободноживущих форм [10]. Важным источником дополнительного азота является биологический азот, который аккумулируется в почве бактериями, связывающими молекулярный азот воздуха. Бобовые растения обладают способностью фиксировать азот за счет симбиоза с

клубеньковыми бактериями [20]. Клубеньковые бактерии питаются органическими соединениями, синтезируемыми растением, а из клубеньков растение получает фиксированные соединения азота. Это и создает симбиотические отношения между бактериями и растениями.

Каждая клубеньковая бактерия взаимодействует со своим растением-хозяином, ниже представлен небольшой список растения-хозяина и вид ризобий (таблица 1).

Таблица 1. Взаимодействие ризобий с растением хозяином.

Растение-хозяин	Вид ризобий
Клевер луговой (<i>Trifolium pratense</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
Люцерна посевная (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Rhizobium tropici</i>
Люцерна усечённая (<i>Medicago truncatula</i>)	<i>Sinorhizobium medicae</i>
Горох посевной (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
Лядвенец рогатый (<i>Lotus corniculatus</i> L.)	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>Biserrula pelecinus</i> L.	<i>Mesorhizobium</i> sp.
Робиния ложноакациевая (<i>Robinia pseudoacacia</i> L.)	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
Аморфа кустарниковая (<i>Amorpha fruticosa</i> L.)	<i>Mesorhizobium amorphae</i>
Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	<i>Rhizobium etli</i>
Соя культурная (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

Чина Литвинова (<i>Lathyrus litvinovii</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Чина болотная (<i>Lathyrus palustris</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Чина бледноватая (<i>Lathyrus pallescens</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Чина весенняя (<i>Lathyrus vernus</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium tropici</i>
Чина клубненосная (<i>Lathyrus tuberosus</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Чина гороховидная (<i>Lathyrus pisiformis</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Чина лесная (<i>Lathyrus sylvestris</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium tropici</i>
Чина Гмелина (<i>Lathyrus gmelinii</i>)	<i>Phyllobacterium sp.</i>
Чина луговая (<i>Lathyrus pratensis</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>

Внедрение бактерий в корень растения-хозяина может происходить двумя способами: через верхушку корневого волоска или около его конца. Самый распространенный способ – проникновение бактерий через верхушку корневого волоска (рисунок 1). Известно, что клеточная стенка корня состоит из двух слоев: первичного (альфа-слой) и вторичного (бета-слой). Первичный слой в основном состоит из пектина и гемицеллюлозы, целлюлозных волокон. Целлюлозные волокна альфа-слоя образуют тонкую сетку на кончике корневого волоска. Целлюлозные волокна бета-слоя более плотные, поэтому он прочнее. Бета-слой обычно не достигает

кончиков молодых корневых волосков, но когда рост волоска закончен, его кончик также покрывается двойным слоем целлюлозы. Это связано с тем, что в зоне роста корневого волоска стенки клеток ещё не окрепли, а верхушка волоска не покрыта более прочным бета-слоем. Таким образом, клубеньковые бактерии могут легко проникать через молодые и более мягкие клетки, где затем они образуют симбиотические отношения с растением-хозяином [7]. Растение-хозяин и ризобии впервые вступают в контакт на поверхности растущего кончика корневого волоска. Как только появляется подходящий хозяин, симбиоз начинается со сложного обмена сигналами между растением и бактериями. Этот процесс начинается с выделения растением и ризобиями химических соединений, которые играют важную роль на ранней стадии симбиоза. Корни растений выделяют флавоноиды, индуцирующие синтез Nod-факторов, служат сигнальными молекулами для растений. Если произошел контакт, то корневые волоски скручиваются и бактерии оказываются внутри завитка. В месте проникновения бактерий происходит разрыхление клеточной стенки, гидролитическими ферментами бактерий, что позволяет бактериям заражать клетки корней [48]. Проникая в клетки корневых волосков, бактерии образуют там характерные структуры – инфекционные нити (тяжи), представляющие собой бактерии, заключенные в слизистую массу. После внедрения в растительные клетки, часть бактерий переходит в цитоплазму, это происходит посредством эндоцитоза, и начинают расти, делиться, затем трансформируются в бактериоиды [7]. Бактериоиды – это специфические формы, которые осуществляют симбиотическую азотфиксацию, то есть восстановление азота до иона аммония с помощью ферментного комплекса нитрогеназы. Они становятся своего рода азотфиксирующими органеллами клеток бобовых растений. В клубеньках бобовых, относящихся к группе IRLC (Inverted Repeat-Lacking Clade), превращение ризобий в бактериоиды необратимо, тогда как у других растений это обратимый процесс. Учитывая, что штаммы ризобий могут

образовывать клубеньки в корнях самых разных растений, степень дифференцировки бактерий в бактериоиды и их обратимость близко соответствует видам растений-хозяев, что указывает на то, что процесс дифференцировки индуцируется сигналами растений [12]. Клубеньковые бактерии в растительных клетках находятся внутри вакуолей, окруженных перибактероидной мембраной, производной плазмалеммы растительной клетки. Ткань клубенька, которая заполнена бактериоидами, обычно окрашивается в красноватый цвет из-за связанного с гемоглобином пигмента леггемоглобина. Такой цвет характерен для клубеньков, которые активно фиксируют азот. Леггемоглобин – это белок, который обладает высокой аффинностью кислорода, что облегчает его перенос через клетку растений к бактериоиду. Благодаря этому бактериоиды получают кислород в достаточном количестве для их роста и получения энергии.

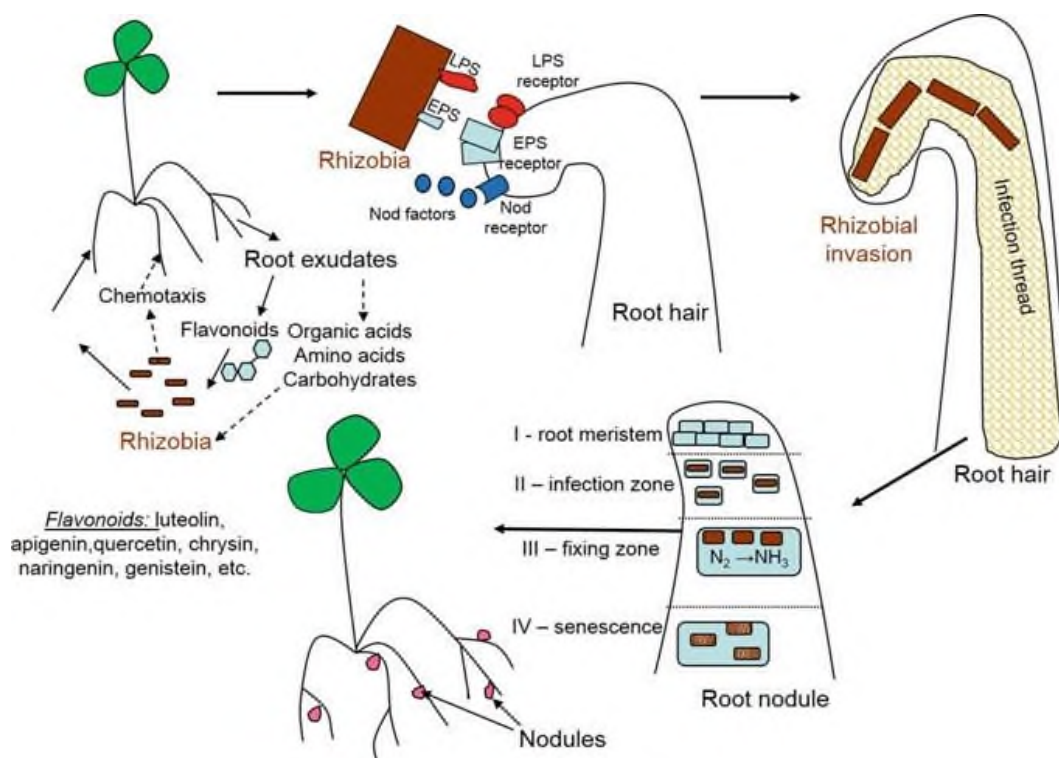


Рисунок 1. Механизм взаимодействия бактерий с растением-хозяином [48].

Симбиотическая специфичность определяется структурой молекул, участвующих во взаимодействии между бактериями и растениями, и как правило, структурой сигнальных молекул, действующих на ранних

стадиях этого взаимодействия. Большинство генов клубеньковых бактерий, участвующих в клубенькообразовании и синтезе сигнальных молекул, в настоящее время детально изучены. Известно, что они объединены в один оперон и находятся под общим регуляторным промотором – Nod-box. Эти гены не экспрессируются в отсутствие растения-хозяина, но исключение ген *nod*, белковый продукт которого является фактором транскрипции, проявляет свою активность только при получении сигнала от растения. Одним из таких факторов является молекула-индуктор флавоноидной природы. Присоединение специфической для данного бобового сигнальной молекулы к рецепторному белку, его конформация изменяется, инициируя экспрессию генов клубенькообразования. Результатом их работы является синтез Nod-факторов, способных запустить программу развития клубеньков у растений за счет активации специфических сигнальных каскадов [8].

Фитогормоны являются ключевыми сигнальными молекулами, участвующими в большинстве физиологических процессов в растениях. Они играют важную роль в инициации, развитии и функционировании симбиоза клубеньков. На сегодняшний день показано, что все группы растительных гормонов, такие как ауксины, цитокинины, этилен, абсцизовая кислота, жасмоновая кислота, салициловая кислота и гиббереллины, участвуют в развитии симбиотических клубеньков [23]. Исследования показали, что сигнальные каскады, активируемые Nod-факторами, приводят к стимуляции цитокининовых ответов в клетках коры корня. У бобовых, которые формируют клубеньки недетерминированного типа (люцерна, горох, клевер), активируются реакции на цитокинины в клетках перicycle, эндодермы и внутренней коры корня, формирующих примордий клубенька. Напротив, у бобовых, которые образуют клубеньки детерминированного типа (соя, лядвенец) активация цитокининового ответа происходит в клетках наружной коры корня. Экспериментальные данные указывают на большую роль ауксина в регуляции образования и

развития клубеньков. Показано, что обработка бобовых культур полярными ингибиторами транспорта ауксинов приводит к появлению клубеньковых структур в корнях, что свидетельствует об участии этой группы фитогормонов в клубенькообразовании. Известно, что цитокинины и ауксины по-разному влияют на развитие побегов и корней. Цитокинины стимулируют образование побегов, ауксин – корней. В апикальной меристеме побега цитокинины стимулируют пролиферацию клеток, а ауксины влияют на их дифференцировку. Цитокинины влияют на дифференцировку клеток корня и ингибируют стимулирующее действие ауксина на клеточное деление, то есть действуют в тесной связи друг с другом [5].

Некоторые штаммы клубеньковых бактерий используют загрязняющие вещества в качестве единственного источника углерода и энергии, при этом с высокой эффективностью нейтрализуется угнетающее действие загрязнителей на естественные процессы самоочищения почвы и воды, восстанавливается обмен веществ, активизируется аборигенная микрофлора, улучшаются процессы почвообразования, аэрации. Одной из причин устойчивости ризобий в условиях загрязнения является их способность синтезировать полисахариды, так как микробные полисахариды являются биосорбентами тяжелых металлов [11]. Природные популяции ризобий являются ценным биоресурсом при поиске штаммов бактерий с полезными свойствами, инокуляция которых значительно повышает урожайность хозяйственно важных культур. Ризобии могут выделять ростостимулирующие вещества, также способны проявлять защитные свойства. Существуют штаммы ризобий, которые могут синтезировать антибиотики и бактериоцины, которые являются токсичными веществами и могут замедлять рост некоторых штаммов бактерий [22].

Кроме клубеньковых бактерий существуют и другие азотфиксирующие бактерии, которые не вступают в симбиоз с растениями.

Род *Azotobacter*. В 1901 году голландский микробиолог М.Бейеринк открыл *Azotobacter chroococcum* (семейство *Azotobacteriaceae*) – аэробную грамотрицательную бактерию, усваивающую молекулярный азот. Это типичный представитель свободноживущих микроорганизмов, т.е. эти микроорганизмы живут в почве независимо от того развиваются они вблизи растения или нет. Молодые клетки азотобактера представляют собой подвижные палочки размером 2-3 x 4-6 мкм, имеют жгутики. Затем они превращаются в крупные кокки до 4 мкм в диаметре, у них появляется толстая оболочка, и они превращаются в цисты [7]. Культуры азотобактера в лабораторных условиях характеризуются полиморфизмом. Полиморфизм зависит от состава среды, в которой он растет. В средах, содержащих этиловый спирт (в качестве источника углерода), азотобактер долгое время сохраняет свою подвижность и палочковидную форму. В то же время полиморфизм проявляется во многих других средах. На плотных безазотистых питательных средах азотобактер образует крупные слизистые, морщинистые колонии, которые с возрастом становятся желто-зелеными, розовыми или коричнево-черными. Колонии разных видов азотобактеров имеют свою специфическую пигментацию. К настоящему времени наиболее изучены виды: *Azotobacter chroococcum*, *A. Beijerinckii*, *A. agilis*, *A. galophilum*, *A. Vinelandii*.

Азотобактерии обычно очень требовательны к органическим веществам, поэтому их много в плодородных почвах [7]. Азотобактерии особенно интенсивно растут на почвах, удобренных соломой и навозом, также в различных компостах, содержащих целлюлозу. Для роста бактериям требуются неорганические питательные вещества, в особенности фосфор и кальций [7].

Азотобактерии распространены в пресноводных водоемах, затопленных рисовых полях, сточных водах, очень влажных почвах, в прудах, водохранилищах. Это говорит о его высокой гидрофильности. Культуры азотобактера образуют значительные количества биоактивных

веществ: витамины группы В, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, биотин, гетероауксин, гиббереллин. Также могут продуцировать ростовые вещества, такие как ауксин. Азотобактер синтезирует анисомициновую группу фунгистатическую (то есть, задерживающий развитие грибов) антибиотиков.

Род *Clostridium*. Первый анаэробный свободноживущий микроорганизм, который усваивает молекулярный азот, был выделен и описан С.Н. Виноградским в 1893 году. Оказалось, что это спорообразующая бактерия, и она была названа *Clostridium pasteurianum*. Палочковидные клетки длиной 1,5-8 мкм и шириной 0,8-1,3 мкм. Молодые клетки имеют перитрихально расположенные жгутики. Они располагаются поодиночке, парами или образуют короткие цепочки. По мере старения клеток плазма становится гранулированной и накапливает зернистые крахмалоподобные вещества. За это время клетки приобретают веретенообразную форму, так как в центре клетки или ближе к её краям образуются споры диаметром значительно больше, чем у вегетативных клеток. Азотфиксирующие функции выявлены у многих представителей рода *Clostridium*: *C. pasteurianum*, *C. beijerinckia*, *C. pectinovorum*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* и других видов.

Клостридии устойчивы к кислой и щелочной среде, диапазон pH, в котором обычно происходит их развитие очень широк. Минимальный pH ниже 4,5, максимальный выше 8,5. Изучено влияние воздушно-водного режима на развитие бактерий рода *Clostridium*. Поскольку они анаэробны, то хорошо переносят повышенное водонасыщение почвы. Бактерии рода *Clostridium* проявляют различное температурное поведение и считаются мезофильными и термофильными бактериями. Молекулы азота фиксируются только мезофильными бактериями. Для мезофильных форм оптимальная температура развития обычно в диапазоне 25-30°C.

Клостридии имеют метаболические отношения со многими микроорганизмами в почве, которые как ожидается будут обмениваться

метаболитами. Их способность превращаться в споры при неблагоприятных условиях объясняет широкое и почти повсеместное распространение.

Род *Beijerinckia*. Бактерии рода *Beijerinckia* впервые были выделены из кислых тропических почв pH 4,5-5,2 в Малайзии, Бангладеш, Бирмы. Описано много видов бактерий этого рода: *B. indica*, *B. fluminensis*, *B. derxii*, *B. mobilis* [7]. Клетки бактерий рода *Beijerinckia* могут быть палочковидными, овальными или круглыми. Бывают подвижные и неподвижные клетки; иногда образуются капсулы; цисты и эндоспоры отсутствуют. Культура характеризуется медленным ростом. Большинство бактериальных культур рода *Beijerinckia* образуют вязкие, блестящие, часто складчатые слизистые колонии на безазотистых средах, содержащих глюкозу. Колонии с возрастом становятся красноватыми или темно-коричневыми. Виды *Beijerinckia* не поглощают ароматические вещества и очень мало органических кислот. Развитие на углеводосодержащих средах приводит к накоплению кислых продуктов (уксусной и других органических кислот). Они менее чувствительны к повышенным концентрациям солей железа и алюминия, нуждаются в молибдене. Молекулярному азоту бактерии этого рода предпочитают минеральный азот и многие аминокислоты.

Бактерии рода *Beijerinckia* часто встречаются в кислых почвах субтропических и тропических районов. Редко встречаются в умеренном климате. Бактерии *Beijerinckia* обычно встречаются на поверхности листьев тропических растений Индонезии. Играют важную роль в балансе азота, в основном на кислых почвах, но не имеет агрономического значения на нейтральных почвах.

Другие свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы

Род *Azomonas*: *A. insignis*, *A. agilis*, *A. macrocytogenes*. *A. insignis*, *A. agilis* – обитают в воде, *A. macrocytogenes* – в почве. *Azomonas* тесно связаны с *Azotobacter* и отличаются многими морфологическими и

физиологическими особенностями. *A. Agilis* характеризуется относительно крупными клетками овальной формы с перитрихальными жгутиками, *A. insignis* имеет крупные, но более округлые клетки с полярными или лофотрихальными жгутиками, а *A. Macrocytogenes* имеет клетки размером 8-10 мкм с полярным жгутиком. Имеют колонии с розовым пигментом, который флуоресцирует в УФ-лучах. Представители рода *Azomonas* являются аэробными организмами. Широко распространены в тропических почвах.

Род *Derxia* выделены из индийской почвы при pH 6,5. Медленнорастущие на безазотистых средах палочковидные бактерии со слизистой капсулой, несущие на определенных стадиях развития жгутики. Колонии пленочные или слизистые, с возрастом становятся желтовато-коричневого цвета. Один из представителей этого рода, *Derxia gummosa*, растет на почвах с pH 4,5-6,5. Виды этого рода широко распространены в почвах тропических регионов, таких как Индия, Индонезия, Африка, Южная Америка.

1.2. Регуляция численности бактерий в ризосфере и почве

Ризосфера – это зона почвы от её поверхности до места, где микробиота не подвергается воздействию корней. Границы ризосферы варьируются в зависимости от типа растения, типы почвы, влажности и других факторов [25]. В ризосфере обитают сложные бактериальные сообщества, которые могут влиять на рост растений. Различные виды растений могут по-разному влиять на бактериальные сообщества. Однако генетические признаки, обнаруженные у одного и того же вида растений, то есть генотипы разных растений, также могут определять бактериальные сообщества в ризосфере [47]. Ризосфера характеризуется ферментативной активностью, существенно отличающейся от остального объема почвы – концентрацией белковых биокатализаторов гидролитических и метаболических процессов. Слой почвы, непосредственно прилегающий к поверхности корней, наиболее богат микроорганизмами. В ризосфере количество микроорганизмов в сотни и тысячи раз больше, чем в почве вне корневой системы [6]. Различия в биодоступности и ассимиляции соединений углерода почвенными микроорганизмами избирательно способствуют развитию одних таксонов и подавляют другие [37]. Растения выделяют значительную часть своих фотосинтетических соединений в виде корневого экссудата, который служит ресурсом для микроорганизмов, помогают улучшить приспособленность растений с помощью различных воздействий, способствующих росту растений. Ризосфера также является первой линией защиты растения от патогенной инфекции и действует как первый фильтр для подмножества микроорганизмов, которые колонизируют корни в виде эндофитов [39]. Недавние достижения в области секвенирования значительно расширили наше понимание микробиома ризосферы различных растений. Разнообразие и состав бактериальных сообществ ризосферы зависят как от видов растений, так и от свойств почвы. Все растения являются организмами с ограниченным содержанием минералов и часто поражаются

патогенами. Чтобы преодолеть эти ограничения, растения образуют ризокомплексы независимо от филогении хозяина. Таким образом, все растения могут оказывать глобальное селективное воздействие на поглощение питательных веществ или подавление патогенов, независимо от их географического происхождения или местоположения [38].

Механизм миграции бактерий к корням растений основан на хемотаксисе и аэротаксисе. Корни растений активно потребляют кислород при дыхании, и вблизи создается градиент концентрации кислорода. Кроме того, вслед за корневыми экссудатами в ризосфере создается градиент концентрации веществ, входящих в состав этих выделений. Бактерии через разнообразный набор рецепторов мигрируют в сторону повышения градиентов и начинают размножаться вблизи и на поверхности корней [15].

Почвенные микроорганизмы развиваются не как отдельные виды, а как сложное и многофункциональное сообщество, образующее биологическую сеть. Их количество варьируется в зависимости от поступления и распределения органического вещества [26]. Известно, что на распространение в почве микроорганизмов, в частности бактерий, значительное влияние оказывает корневая система растений. По мере роста вокруг корней скапливается больше бактерий, чем в остальной части почвы. Это явление вызывается выделением растениями определенного количества органических соединений в прикорневую зону почвы. Кроме того, разные растения выделяют в почву определенные вещества. Например, в выделениях бобовых растений обнаруживаются аминокислоты. Помимо этих выделений, растения непрерывно удаляют с поверхности корней отмершие клетки эпидермиса и корневые волоски, которые являются субстратом для микробного питания [6]. Связанные с корнями микроорганизмы, симбиотические или свободноживущие, играют важную роль в питании и здоровье растений, и по этой причине ризосферу сравнивают с кишечником человека. Почвенные бактерии, такие как

Pseudomonas, *Bacillus*, *Rhizobium*, могут увеличивать концентрацию фосфора в почве доступного для растений, за счет высвобождения ферментов фосфатазы или органических хелатов. Известно, что продукция корневых экссудатов и высвобождение соединений углерода почвенными микробами запускают микробную активность и выработку экзоферментов, ещё больше ускоряя разложение органических молекул и высвобождение питательных веществ в ризосфере. Считается, что некоторые штаммы *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* повышают доступность и усвоение микроэлементов, таких как Zn и Fe, в бобах, рисе и кукурузе. Ускоренный рост растений также связан с индукцией изменений в структуре корней растений и увеличением площади поверхности корней, которые могут поглощаться секретируемыми бактериями растительными гормонами, такими как индол-3-уксусная кислота, гиббереллины и цитокинины [37].

Впервые Бейеринк и Ван Делден в 1902 г. определили, что помимо *Rhizobium* в клубеньках клевера присутствует также бактерия *Agrobacterium radiobacter*. Впоследствии в работах были описаны три рода корневых эндофитов клевера: *Aerobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*. Сравнение биоразнообразия эндофитов в разных частях растения показало, что по всему растению систематически присутствуют несколько видов бактерий, в том числе типичные клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, в то время как другие бактерии приурочены к определенным экологическим нишам. В зависимости от потребностей макросимбионта численность эндофитных бактерий в разных органах и тканях растений может варьировать. Клубеньки могут поддерживать наибольшее количество эндофитных бактерий. Клубеньки сои содержат 10^5 - 10^7 КОЕ/г сырой массы, что на два порядка превышало количество эндофитных бактерий в тканях стебля и корня [4].

В связи с широким использованием ризобий для пересадки бобовых культур большой интерес вызывают генетические процессы, которые

происходят в бактериальных популяциях при адаптации к условиям почвы, ризосферы в зонах естественного произрастания и сельскохозяйственного возделывания растения-хозяина. По сравнению с естественными местообитаниями гетерогенность популяций в зонах возделывания растений может как увеличиваться, так и уменьшаться. Ризобии, выделенные из дикорастущих бобовых, в целом характеризуются более выраженной симбиотической специфичностью, чем ризобии, выделенные из возделываемых форм. Это было продемонстрировано для популяции ризобий гороха (*Pisum sativum*) из неокультуренных почв Англии, а также для ризобий клевера (*Trifolium ambiguum*), где генетическое разнообразие кавказских популяций (центр происхождения *T. ambiguum*) значительно больше, чем у североамериканской популяции [14].

Почвенные бактерии являются активными инженерами почвы, подготавливая почву для роста растений, обеспечивая питательными веществами и производя необходимые регуляторы роста. Они также участвуют в метаболизме органического вещества и распаде ксенобиотиков в почве. Природные микробные сообщества играют различную функциональную роль в адгезии и десорбции неорганических питательных веществ к физическим поверхностям и разложению органических остатков, чтобы сделать их частью почвы. Помимо почвообразования, круговорот питательных веществ, важная часть поддержания плодородия почвы, контролируется бактериями в различных биогеохимических циклах [44]. Почва содержит миллиарды микроорганизмов, включая бактерии и грибы. Ризобии могут конкурировать с этими микробами в почве или ризосфере потенциально бобовых хозяев для установления симбиотических отношений. Сообщается, что бобовые растения, такие как *Ligustrum japonicum*, *Medicago truncatula* и соя, играют важную роль в создании бактериальных сообществ в ризосфере или корнях, а симбиоз между ризобиями и бобовыми напрямую влияет на структуру микробиоты в этих двух

компартаментах [33]. Почва играет важную роль в поглощении CO_2 в атмосфере. Количество углерода, который поступает в почву в виде CO_2 , в первую очередь определяется микробной активностью. Повышенный уровень CO_2 стимулирует разложение органического вещества, что приводит к деградации или высвобождению питательных веществ в почве. Было обнаружено, что изменения численности и разнообразия микробов в ризосфере зависят от присутствующих видов растений, стадии их развития, морфологии корневой системы, pH и состава выделяемых химических веществ. Корни молодых растений более активно стимулируют микробный рост за счет интенсивной динамики внутриклеточных физиолого-биохимических процессов. Зрелые и стареющие корни растений выделяют более сложные соединения углерода или вторичные метаболиты, тем самым обогащая более специализированные микробные сообщества. Воздействие растений на микробные сообщества связано с активностью почвенных ферментов. Ферментативная активность считается одним из наиболее чувствительных показателей плодородия и продуктивности почвы, а также микробного разнообразия почвы [28].

1.3. Антибактериальные соединения микроорганизмов

Эндофитные микроорганизмы рассматриваются как потенциальный источник новых антибиотиков и других биологически активных веществ для медицинских, сельскохозяйственных и биотехнологических целей. В настоящее время исследования показывают большое разнообразие видов микроорганизмов-эндофитов и выделенных из них разнообразных соединений с различным биологическим действием [16]. Ассоциированная с растениями микробиота обычно состоит из микроорганизмов, которые производят множество вторичных метаболитов, включая антибиотики, токсины, сидерофоры, биосурфактанты, которые могут влиять на установление взаимодействия между растениями и бактериями [35].

Производство сидерофоров и биосурфактантов является отличительной чертой многих бактерий, ассоциированных с растениями, и антибактериальные свойства многих из этих соединений представляют интерес как в медицине, так и в сельском хозяйстве. Сидерофоры представляют собой железохелатирующие агенты, продуцируемые многими бактериями, в том числе бактериями, ассоциированными с растениями, такими как *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum*, *Rhizobium*. Сидерофоры имеют ключевую роль и применение в сельском хозяйстве для борьбы с патогенами растений и стимулирования роста растений. В медицине сидерофоры используются для образования комплексов с антибиотиками, чтобы помочь избирательно доставлять антибиотики к резистентным бактериям и лечить заболевания, такие как малярия, рак. Биосурфактанты представляют собой амфифильные соединения микробного происхождения, такие как гликолипиды, фосфолипиды, липопептиды, липопротеины и липополисахариды. Производство биосурфактантов является общей чертой для бактерий ассоциированных с растениями, таких как *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*. Биосурфактанты влияют на ключевые бактериальные процессы, такие как подвижность поверхности,

образование биопленки и инвазия, которые определяют эффективность и успешность взаимодействия биосурфактантов между бактериями и растениями. Многие биосурфактанты обладают антибактериальными, противогрибковыми, противовирусными свойствами и широко используются в фармацевтической, сельскохозяйственной, пищевой, нефтяной отраслях [35].

Пигмент пиоцианин, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa*, это соединение проявляло противогрибковую активность в отношении *Fusarium oxysporum* Schlech. Штамм *Enterobacter agglomerans* IC 1270 продемонстрировал свой потенциал в качестве антагонистического микроорганизма против грибковых и бактериальных патогенов, этот штамм продуцирует антибиотик пирролнитринового типа, который обладает фунгистатической активностью против *Alternaria spp.*, а также выраженной бактерицидной активностью по отношению к *Agrobacterium tumefaciens*. Виды *Streptomyces* из семейства *Enterobacteriaceae* продуцируют катехолатную форму энтеробактина, считающееся характерным метаболитом этого семейства, проявляло железохелатирующую активность [43].

Низин представляет собой антимикробный пептид, синтезируемый *Lactococcus lactis*. Он проявляет антимикробную активность в отношении широкого спектра грамположительных бактерий и особенно эффективен в отношении спор [1]. Низин быстро разрушается в желудке ферментами до аминокислот; не проявляет антимикробного действия на *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella*. Его антимикробное действие обусловлено разрушением цитоплазматической мембраны, приводящее к лизису клетки. Также инактивирует сульфгидрильные группы в мембране, являясь в этом случае ингибитором как вегетативных клеток, так и спор [13].

Натамицин – бактерицидный противогрибковый препарат, синтезируемый бактериями *Streptomyces natalensis*, *Streptomyces chatanoogen* путем ферментации на углеводной среде. Его концентрируют,

кристаллизуют, сушат и смешивают с лактозой в соотношении 1:1. Активен в отношении большинства дрожжеподобных грибов, дрожжей [1]. Натамицин обладает способностью связываться, трансформировать и разрушать стеролы клеточной мембраны, позволяя ключевым важным метаболитам просачиваться наружу, и тем самым клетка умирает. Он неактивен в отношении полезных бактерий [13].

Энтероцины – это бактериоцины, синтезируемые бактериями рода *Enterococcus*. Как продукт молочнокислых бактерий, он оказывает ингибирующее действие на *Listeria*, *Clostridium*, и так может представлять интерес в качестве защитной культуры для производства сыра. Применение энтероцина в сочетании с низином и педиоцином обеспечивает большую антибактериальную эффективность в отношении *Enterococcus faecium* [24]. Первым успешно очищенным энтероцином стал энтероцин As-48, продуцируемый *E. faecium*, классифицированный как циклический пептидный антибиотик. Это открытие впоследствии привело к открытию новых энтерококков, продуцирующих энтероцины [36].

Педиоцин – эффективное средство в составе антимикробных упаковок. Пленки с 50%-м содержанием педиоцина эффективно ингибирует рост *Listeria innocua* и оказывает небольшое воздействие на *Salmonella sp.* [36]. Педиоцин действует на цитоплазматическую мембрану в процессе образования пор; препятствует включению аминокислот в фосфолипиды цитоплазматической мембраны клеток-мишеней. Молекула педиоцина обладает уникальными свойствами, такими как термостабильность и сохранение активности в широком диапазоне pH и устойчивость к некоторым ферментам протеазам [41].

Непатогенные почвенные бактерии живут в симбиозе с корнями высших растений, повышая адаптивные способности хозяина и стимулируя рост. Есть несколько свойств, которые позволяют ризобиям действовать как агенты биоконтроля. Они конкурируют с патогенами растений за экологические ниши, продуцируют различные

противогрибковые соединения, влияют на защитные системы растений, стимулируют рост растений посредством увеличения доступности для поглощения из почвы питательных веществ. Из-за широкого круга хозяев, способности образовывать эндоспоры и продуцировать различные антибиотики *Bacillus subtilis* подходит в качестве агента биоконтроля. Основную часть антибиотиков *B. subtilis*, подавляющих фитопатогены, составляют производные пептидов, нерибосомально синтезируемые, в основном липопептиды. Липопептидные антибиотики образуются путем соединения β -гидроксильных остатков или β -аминогрупп с жирными кислотами. Длина и разветвленность цепи жирных кислот и аминокислотные заместители определяют свойства продукта [21].

Фенгицин объединяет в своей структуре несколько соединений: компоненты циклических, разветвленных и редких веществ. Фенгицин обладает противогрибковой активностью в отношении некоторых нитевидных грибов. Его успешно использовали для борьбы с *Fusarium moniliforme*, подавляя при этом рост мицеллия и спорообразование. Возможным механизмом противогрибковой активности фенгидина является взаимодействие молекул стирола и фосфолипидов в мембране, нарушающее структуру мембраны клетки-мишени [21].

Ризоктицин представляет собой фосфатсодержащий олигопептидный антибиотик, синтезируемый грамположительной бактерией *B. subtilis* ATCC 6633. Ризоктицин проникает в клетки грибов через транспортную систему олигопептидов. В результате небелковые фосфатсодержащие аминокислоты высвобождаются пептидазами и ингибируется синтез белка. Фосфонатные соединения широко используются среди биологически активных веществ, в основном благодаря их способности воздействовать на карбокси- и фосфатсодержащие метаболиты [21].

Субтилилин представляет собой пентациклический лантибиотик из 32-аминокислот, структурно родственный низину (*Lactococcus lactis*) и широко используется в биозащите. Биологическая активность

лантибиотиков, продуцируемых грамположительными бактериями, подавляет синтез пептидогликана, укорачивая его молекулы и способствуя образованию пор. Высокое содержание липопептида микосубтилина были обнаружены в штаммах *B. Subtilis* [21].

Даптомицин продуцируется *Streptomyces roseosporus* как один из компонентов антибиотического комплекса, членом которого является кислый липоциклодепсипептид. Мишенью действия антибиотика является клеточная мембрана. Присутствие ионов кальция при нейтральном pH делает молекулу более гидрофобной и повышает эффективность воздействия вещества на билипидный слой мембраны. Конформационные изменения зависят от кальция и позволяют антибиотику проникать глубоко в бислой, вызывая разрушение мембраны, ведущее к гибели клеток. Даптомицин широко используется в клинической практике при кожных инфекциях [17].

Фриулимицин В представляет собой водорастворимый циклический липопептид, синтезируемый *Actinoplanes friuliensis*. Антибиотик работает против грамположительных бактерий. Фриулимицин ингибирует синтез клеточной стенки, образуя Са-зависимый комплекс с ундекапренолфосфатом, он вмешивается в биосинтетический цикл предшественников клеточной стенки, тем самым предотвращая образование липидных интермедиатов в биосинтезе пептидогликана. Поскольку ундекапренолфосфат необходим как для биосинтеза тейхоевой кислоты, так и для образования капсулы, фриулимицин блокирует ключевой метаболический путь для функции клеточной мембраны [17].

Сафрамицин А образуется *Streptomyces lavendulae* и одновременно синтезирует 10 вторичных компонентов, по структуре они аналогичны основному продукту. Сафрамицин эффективен в отношении опухолей, меланомы. Механизм действия заключается в том, что восстановленная форма препарата ковалентно связывается с ДНК, превращая её в одноцепочечную форму [18].

Лейнамицин представляет собой тиазолсодержащее природное соединение, продуцируемое *Streptomyces atroolivaceus*. Лейнамицин обладает сильным противораковым действием, и это вещество особенно эффективно против клеток, устойчивых к клинически важным лекарствам. Мишенью действия является ДНК, биосинтез которой ингибируется образованием одноцепочечной ДНК под алкилирующим действием восстанавливающего промежуточного продукта лейнамицина [18].

Комплестатин – соединение типа ванкомицина, синтезируемое *Streptomyces lavendulae*. Это вещество не активно против микроорганизмов, но взаимодействует с иммунной системой. Связываясь с комплементом, комплестатин ингибирует гемолиз и фибринолиз [18]. Урактапелстатин А вырабатывается морской бактерией *Mechercharimyces asporophorigenes* и ингибирует рост клеток рака легких человека. Бингчамиды А и В, выделенные из мицелия *Streptomyces bingchenggensis*, представляют собой циклопентапептиды, активные против раковых клеток желудочно-кишечного тракта. Может быть использован для получения новых противоопухолевых агентов [18].

Эндоспорообразующие бактерии, которые принадлежат к роду *Paenibacillus*, распространены повсеместно. Многие виды рода *Paenibacillus* известны своей продукцией антибиотиков, особенно полимиксина против грамотрицательных бактерий, фузарицидина против грибов, оомицетов, грамположительных бактерий и их азотфиксацией. Подобно бациллам, образующим эндоспоры, простота массового производства в жидкой культуре, простота приготовления и длительный срок хранения делают *Paenibacillus* многообещающим биологическим пестицидом и биоудобрением [27].

Бактериоцины представляют собой более мелкие полипептидные молекулы, синтезируемые на рибосомах, которые проявляют антагонистическую активность в отношении близкородственных групп бактерий. Впервые бактериоцины были выделены почти 100 лет назад, как

рибосомносинтезированные, антимикробные пептиды, которые нарушают целостность мембраны клетки-мишени, образуя поры, что приводит к гибели клеток. Большинство бактериоцинов имеют две характеристики, отличающие их от традиционных антибиотиков: синтезируются рибосомно и обладают узкой антимикробной устойчивостью [30]. Бактериоцины являются продуктами первичного метаболизма, которые синтезируются в периодических культурах на логарифмических стадиях развития, ограничивают свою активность штаммами родственных видов и не оказывают отрицательного воздействия на кишечную микрофлору человека нежели антибиотики [34]. Бактериоцины продуцируются многими грамположительными и грамотрицательными бактериями. Большинство бактериоцинов представляют собой катионные, термостабильные, низкомолекулярные, амфифильные, разрушающие клеточную мембрану пептиды [1]. Существуют различные классификации бактериоцинов, но их разнообразная ингибирующая активность и химическая структура делают их классификацию в какую-либо определенную группу достаточно сложной. Бактериоцины 1 класса, известные как антибиотики, которые содержат в своей структуре необычные аминокислоты, это дегидроаланин, лантионин – уникальные аминокислоты, обеспечивающие антимикробную активность и пептидную стабильность и образованные посттрансляционными модификациями. Бактериоцины 2 класса неантибиотики или педиоциноподобные антибиотики, представляют собой мембраноактивные и термостабильные пептиды, они не имеют модифицированных аминокислот. Бактериоцины 3 класса – это крупные термолабильные пептиды, которые состоят из N-концевого домена эндопептидазы и C-концевого домена распознавания субстрата. Они могут растворять клеточную стенку чувствительных бактерий. Бактериоцины 4 класса представляют собой сложные пептидные структуры, связанные с липидными и углеводными фрагментами, которые образуют гликопротеины и липопротеины. Бактериоцины 5 класса

включают в себя циклические пептидные структуры, благодаря их круговой природы у них превосходная устойчивость к стрессам [29]. Наибольший интерес среди белковых ингибиторов роста бактерий представляют синтезированные рибосомами и посттрансляционно-модифицированные пептиды (RiPP). Хорошо известным соединением являлся трифолитоксин, который продуцируется *Rhizobium leguminosarum* bv.trifolii T24 и представляющий собой тиазол-оксазол содержащий посттрансляционно-модифицированные пептиды. Недавно открытый пептид, синтезируемый на рибосомах тиазол-оксазол модифицированный пептид – фазолицин. Штамм был выделен из клубеньков дикой фасоли (*Phaseolus vulgaris*) в тропическом лесу Лос-Тукстлас в Мексике. Фазолицин является узкоспециализированным ингибитором трансляции, блокирующий работу рибосом лишь некоторых бактерий порядка *Rhizobiales* [49]. Фазолицин и трифолитоксин расширяют известное разнообразие посттрансляционно-модифицированных пептидов и могут быть использованы в будущем в качестве биоконтроля для сельского хозяйства. Бактериоцины могут быть полезны при конкуренции за питательные вещества и местообитания в ризосфере, области около корня растения, поскольку помогают предотвращать конкуренцию с другими видами бактерий. Производство бактериоцинов может быть эффективным инструментом в борьбе с патогенными микроорганизмами, которые могут нанести вред растению. Могут также снижать уровень инфекций в почве, что приводит к повышению урожая, улучшению качества продукции и защите окружающей среды. До сих пор исследования синтеза ризобиями соединений, которые подавляют или регулируют численность посторонней микрофлоры, проводились на единичных штаммах. Практически нет данных о характере распространенности явления и параметров синтеза антибактериальных соединений в природных популяциях ризобий.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования в данной работе служили 60 штаммов бактерий из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН (таблица 2). В качестве контроля использовали штамм-продуцент антимикробного соединения фазолицина – Pcp5.

Таблица 2. Список штаммов, используемых в работе.

№	Название штамма	Растение-хозяин
1	ГЛ1	Горошек лесной (<i>Vicia sylvatica</i> L.)
2	ГЛ2	
3	ГЛ3	
4	ГЛ4	
5	ГЛ5	
6	ГЛ6	
7	ГЛ7	
8	ГЛ8	
9	ГЛ9	
10	ГЛ10	
11	ГЛ12	
12	ГЛ13	
13	ГЛ14	
14	ГЛ15	
15	ГЛ16	
16	ГЛ17	
17	ГЛ18	
18	ГЛ19	
19	ГЛ20	
20	ГЛ21	
21	ЧБ1	Чина бледноватая (<i>Lathyrus pallescens</i> (Bieb.) C. Koch)
22	ЧБ2	
23	ЧБ3	
24	ЧБ4	
25	ЧБ5	
26	ЧБ6	
27	ЧБ7	
28	ЧБ8	

Продолжение таблицы 2.

29	ЧБ9	Чина бледноватая (<i>Lathyrus pallescens</i> (Bieb.) C. Koch)
30	ЧБ10	
31	ЧБ11	
32	ЧБ12	
33	ЧБ13	
34	ЧБ14	
35	ЧБ15	
36	ЧБ16	
37	ЧБ17	
38	ЧБ18	
39	ЧБ19	
40	ЧБ22	
41	ЧВ5*	Чина весенняя (<i>Lathyrus vernus</i> L. Bernh.) Инзер
42	ЧВ6*	
43	ЧВ7*	
44	ЧВ8*	
45	ЧВ9*	
46	ЧВ10*	
47	ЧВ12*	
48	ЧВ13*	
49	ЧВ14*	
50	ЧВ16*	
51	ЧВ10	Чина весенняя (<i>Lathyrus vernus</i> L. Bernh.)
52	ЧВ11	
53	ЧВ12	
54	ЧВ13	
55	ЧВ14	
56	ЧВ15	
57	ЧВ16	
58	ЧВ17	
59	PVu2	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)
60	PVu5	

Для определения механизма антибактериальной активности использовали штамм *E. coli* BW25113ΔtolC, трансформированный векторной конструкцией pDualrep2 (далее *E.coli*ΔTolC).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования клубеньковых бактерий

В работе использовали 4 разные по составу питательные среды.

1. YM:

1% маннитол, 0,01% NaCl, 0,05% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄, 0,04% дрожжевой экстракт.

2. TY:

1% триптон, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,1% CaCl₂.

3. RM:

1% маннитол, 0,01% NaCl, 0,05% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄, 0,1% дрожжевой экстракт.

4. C40:

2% сахароза, 0,02% KH₂PO₄, 0,08% K₂HPO₄, 0,02% MgSO₄·7H₂O, FeCl₃ (следы), Na₂MoO₄ (следы), 0,04% дрожжевой экстракт.

Стерилизацию чашек проводили в автоклаве при 121°C в течение 30 минут. Для наращивания *E. coli*ΔTolC использовали ампициллин (50 мкг/мл).

2.2.2. Оживление штаммов клубеньковых бактерий после криохранения

Штаммы, взятые из коллекции, хранятся в морозильной камере при -70°C. В качестве вещества, который защищает бактерий от повреждающего действия замораживания, то есть криопротектор, был использован 30% глицерин. Для того чтобы оживить штаммы из коллекции они были помещены в замороженный штатив. Далее небольшое количество замороженных клеток брали бактериологической петлей, которая простерилизована в пламени горелки, и переносили на твердую, плотную питательную среду YM. Всю работу проделывали в ламинарном

боксе. Затем чашки Петри помещали в термостат с температурой 28°C и инкубировали в течение 1-2 суток.

2.2.3. Получение бактериального газона

Для получения бактериального газона использовали коллекционные штаммы клубеньковых бактерий из коллекции «Симбионт» Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН: ГЛ9 (*Rhizobium leguminosarum*, выделенный из клубеньков растения горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.)) и Pvu2 (*Rhizobium phaseoli*, полученный из клубеньков растений фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.)), стабильно растущие в течение 2 суток в жидкой питательной среде УМ.

На чашки Петри наносили 3 мл двухсуточной суспензии ризобий на питательную среду с агаром, покачиванием чашки Петри распределяли бактерии по среде, а остаток убирали, используя дозатор со сменными стерильными наконечниками. Затем чашки Петри для подсушивания посева оставляли приоткрытыми. Бактерии инкубировали сутки в термостате при температуре 28°C. Работа проводилась в БМБ-II «Ламинар-С»-1,2 – боксе микробиологической безопасности.

Для получения газона *E. coli*ΔTolC использовали ночную культуру рекомбинантного штамма, которая была выращена на среде LB (Лурия-Бертани) с добавлением антибиотика ампицилина по 50 мкг/мл.

2.2.4. Определение механизма антибактериальной активности

Для выявления антимикробной активности использовали систему представленную штаммом *E. coli* BW25113ΔtolC. В данную бактерию встроен плазмидный вектор pDualrep2, который содержит гены двух флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм) (рисунок 2).



Рисунок 2. Схема используемой репортерной системы [45].

В случае если антибиотик действует на процесс синтеза белка (например, RiPP пептиды), экспрессия дальнего красного белка Katushka2S возрастает. Экспрессия красного флуоресцентного белка RFP увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа при повреждении ДНК. Сам штамм *E. coli* BW25113ΔtolC сверхчувствителен к антибиотикам, поскольку состоит из бактерий с удаленным геном tolC. TolC является основным порином, выводящим различные соединения из клетки через внешнюю мембрану, включая сидерофоры (например, энтеробактин), макролидные антибиотики и некоторые RiPP (например, микроцин J25).

2.2.5. Скрининг штаммов на синтез антибактериальных соединений на газоне ризобий

Проводили наращивание бактериальной суспензии исследуемых штаммов в 4 мл питательной среды YM, в 15 мл пробирках типа Falcon. Инкубация пробирок происходила в термостатируемом шейкере ES-20 (BioSan, Латвия) в течение 2 суток при температуре 28°C, также инкубировали штаммы для бактериального газона ГЛ9 и Pvu2. В случае при получении большего объема бактериальной суспензии штаммы для подложки выращивались в стеклянных колбах в 100 мл. При анализе продукции антибактериальных соединений бактериями в процессе их роста в среду добавляли по 500 мкл суспензии и переносили в стерильные пробирки эппендорф. Далее бактерии осаждались в центрифуге MiniSpinPlus (Eppendorf, Германия) при 8000 об/мин в течение 5 минут. Затем на бактериальный газон вносили по 0,5 мкл собственно суспензии клеток и по 5 мкл надосадочной жидкости. После чашки помещались в

термостат на сутки при температуре 28°C. Как заканчивалась инкубация, проводили визуально оценку зон ингибирования.

2.2.6. Скрининг штаммов на синтез антибактериальных соединений на газоне клеток *E. coli*ΔTolC, трансформированных векторной конструкцией pDualrep2

Проводили наращивание бактериальной суспензии исследуемых штаммов в 4 мл питательной среды YM, в 15 мл пробирках типа Falcon. Инкубация пробирок происходила в термостатируемом шейкере ES-20 (BioSan, Латвия) в течение 2 суток при температуре 28°C. На питательной среде LB с добавлением антибиотика (ампициллин 50 мкг/мл) в течение суток выращивали контрольный штамм-подложку *E. coli*ΔTolC. При анализе продукции антибактериальных соединений бактериями в процессе их роста в среду добавляли по 500 мкл суспензии и переносили в стерильные пробирки эппендорф. Далее бактерии осаждались в центрифуге MiniSpinPlus (Eppendorf, Германия) при 8000 об/мин в течение 5 минут. Затем на бактериальные газон вносили по 0,5 мкл собственно суспензии клеток и по 5 мкл надосадочной жидкости. После чашки помещались в термостат на сутки при температуре 37°C. Как заканчивалась инкубация проводили визуально оценку зон ингибирования, с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США) проводили также детекцию зон подавления контрольного штамма *E. coli*ΔTolC с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США). Фотодокументирование проводили, используя следующие длины вол для определения флуоресцентных белков: 602/50 нм белок RFP, 700/50 нм Katushka2S.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор штаммов и условий культивирования для бактериального газона

Для исследования были выбраны коллекционные штаммы клубеньковых бактерий из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН: ГЛЗ, ГЛ7, ГЛ9, ГЛ16 (*Rhizobium leguminosarum*, выделенные из клубеньков растения горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.)) и Pvu2, Pvu5 (*Rhizobium phaseoli*, полученные из клубеньков растений фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.)). В дальнейшей работе из них были отобраны штаммы, *Rhizobium leguminosarum* ГЛ9 и *Rhizobium phaseoli* Pvu2, для бактериального газона, стабильно растущие в течение 2 суток в жидкой питательной среде УМ и не подавляющие рост других бактерий.

Затем подбирали питательную среду и способ посева для получения газона бактерий. Применяли 4 питательные среды:

- 1) УМ 2) ТУ 3) RM 4) С40

Нанесение бактериальной двухсуточной суспензии осуществляли двумя способами. Первый – растирание суспензии стеклянными шариками. Для этого на чашку Петри с агаризованной питательной средой наносили 500 мкл суспензии бактерий и стерильные стеклянные шарики, затем вращали чашку Петри до равномерного распределения, после шарики удаляли. Второй – 3 мл суспензии ризобий наносили на поверхность агаризованной питательной среды, покачиванием чашки Петри распределяли бактерии по среде, оставшуюся часть удаляли, используя дозатор со сменными стерильными наконечниками. После этого чашки Петри оставляли приоткрытыми для подсушивания посева. Работу проводили в боксе микробиологической безопасности БМБ-II «Ламинар-С»-1,2. Бактерии инкубировали в термостате при 28°C в течение суток.

В результате на питательных средах УМ, RM и С40 формировался ослизненный бактериальный газон по сравнению со средой ТУ. Это

необходимо учитывать, поскольку на данный газон будет раскапываться надсадочная жидкость, и излишняя продукция слизи может перекрыть зону подавления. Равномерный бактериальный газон был получен вторым способом (рисунок 3).

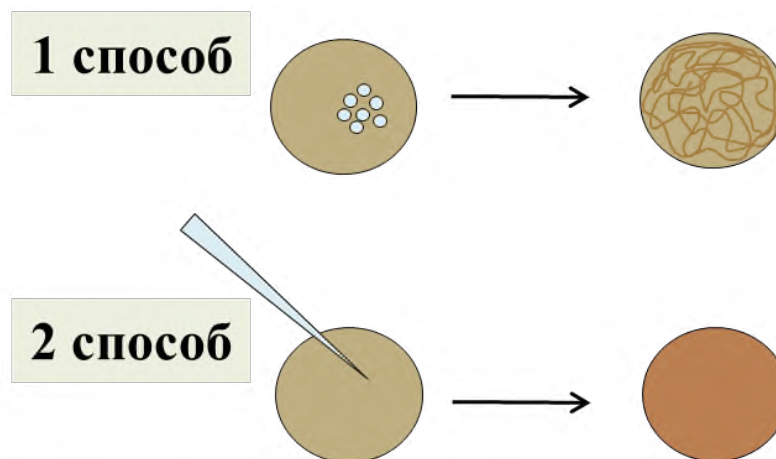


Рисунок 3. Способы получения равномерного бактериального газона.

Таким образом, в дальнейшей работе для получения бактериального газона на основе ризобияльных штаммов использовалась питательная среда ТУ и второй способ получения газона.

3.2. Скрининг коллекционных штаммов клубеньковых бактерий на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий

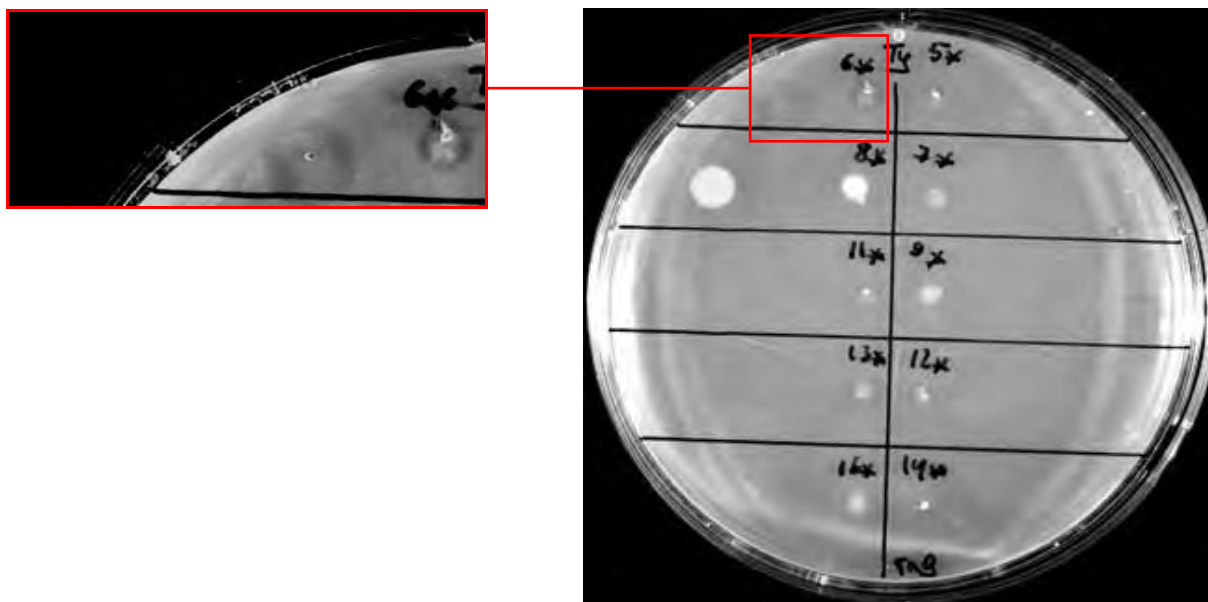


Рисунок 4. Анализ штаммов ризобий, выделенных из клубеньков растения чины весенней (Инзер), на продукцию антимикробных соединений. Штамм-подложка ГЛ9.

На данной иллюстрации видно, что штамм ризобий, выделенных из клубеньков растения чины весенней 6 (*Lathyrus vernus* L. Bernh.), продуцирует соединение неясной природы, которая подавляет рост *Rhizobium leguminosarum*, то есть бактерия ингибирует рост близкородственного штамма (рисунок 4). Возможно, это связано с тем, что у близкородственных бактерий свои общие ресурсы и им есть за что конкурировать. Бактерии могут выделять антибактериальные соединения, например бактериоцины, они могут быть полезны для конкуренции за питательные вещества и местообитания, поскольку помогают предотвращать конкуренцию с другими бактериями. Продукция бактериоцинов – это одна из стратегий, которую используют ризобии для конкуренции.

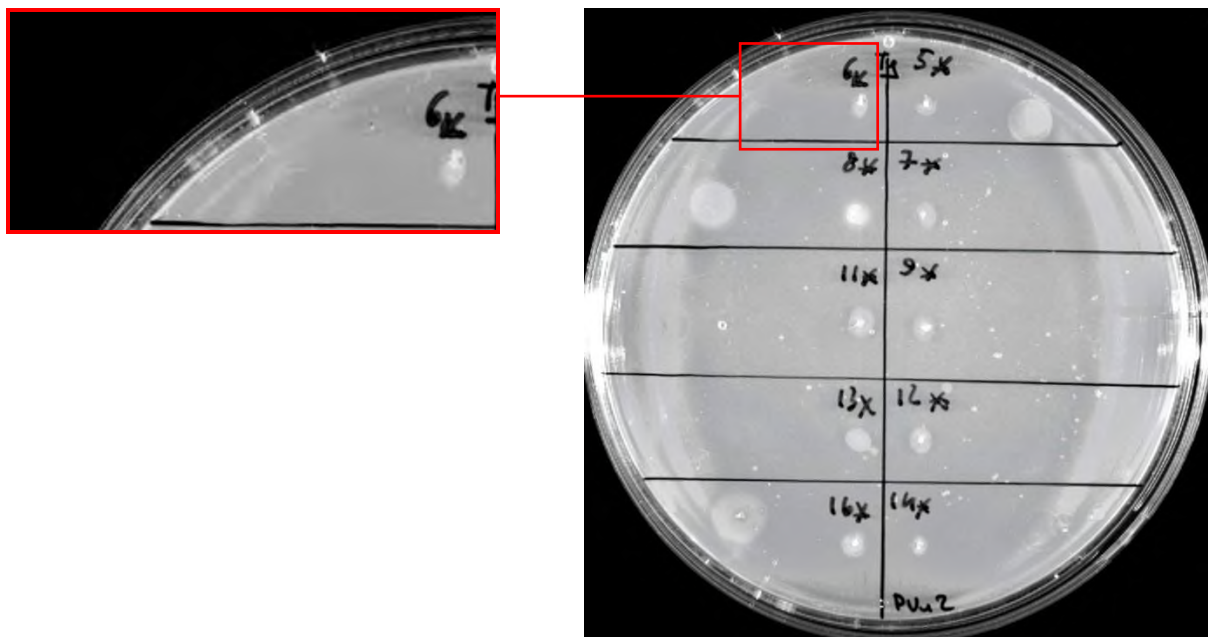


Рисунок 5. Анализ штаммов ризобий, выделенных из клубеньков растения чины весенней (Инзер), на продукцию антимикробных соединений. Штамм-подложка PVu2.

На данной иллюстрации видно, что штамм ризобий, выделенных из клубеньков растения чины весенней 6 (*Lathyrus vernus* L. Bernh.), не продуцирует никакого соединения на *Rhizobium phaseoli*, то есть бактерия не ингибирует рост типового штамма (рисунок 5). Это, может быть, связано с тем, что у данных бактерий разные потребности, ресурсы и для того, чтобы им выжить они могут не конкурировать друг с другом.

Таблица 3. Проявление действия штаммов.

№	Штамм	Наименование в коллекции	Действие			
			<i>R. leguminosarum</i> VSyl9		<i>R. phaseoli</i> PVu2	
			○	●	○	●
1	ГЛ1	Горошек лесной 20.05.08	-	-	-	-
2	ГЛ2		-	-	-	-
3	ГЛ3		-	-	-	-
4	ГЛ4		-	-	-	-
5	ГЛ5		-	-	-	-
6	ГЛ6		-	-	-	-
7	ГЛ7		-	-	-	-
8	ГЛ8		-	-	-	-

Продолжение таблицы 3.

9	ГЛ9	Горошек лесной 20.05.08	-	-	-	-
10	ГЛ10		-	-	-	-
11	ГЛ12		-	-	-	-
12	ГЛ13		+	-	+	-
13	ГЛ14		-	-	-	-
14	ГЛ15		-	-	-	-
15	ГЛ16		-	-	-	-
16	ГЛ17		-	-	-	-
17	ГЛ18		-	-	-	-
18	ГЛ19		-	-	-	-
19	ГЛ20		-	-	-	-
20	ГЛ21		-	-	-	-
21	1	Чина бледноватая (Кандрыкуль) 22.06.2009	-	+	-	-
22	2		-	-	±	±
23	3		-	-	-	-
24	4		+	+	-	-
25	5		-	-	±	±
26	6		-	-	±	±
27	7		-	+	-	-
28	8		-	+	-	-
29	9		-	-	-	-
30	10		-	+	-	-
31	11		±	±	-	-
32	12		-	±	-	-
33	13		-	-	±	±
34	14		±	±	±	±
35	15		-	-	±	±
36	16		-	±	-	±
37	17		-	-	-	-
38	18		-	-	-	-
39	19		±	-	±	-
40	22		-	±	±	-
41	5	Чина весенняя Инзер	-	-	±	-
42	6		+	+	±	-
43	7		-	-	±	-
44	8		-	-	-	-
45	9		-	-	±	-
46	10		-	-	±	-
47	12		-	-	±	-
48	13		-	-	-	-
49	14		-	±	-	±
50	16		-	-	-	±

Продолжение таблицы 3.

51	10	Чина весенняя 10.06.2008	-	-	+	-
52	11		-	-	±	-
53	12		-	-	±	-
54	13		-	±	+	-
55	14		-	+	+	+
56	15		±	-	+	-
57	16		±	-	+	-
58	17		±	±	±	-

Примечание: «°» – это точка суспензии бактерий, «●» – это 5 мкл надосадочной жидкости; «±» – зона подавления от 1 мм до 4 мм, «±» – зона подавления от 4 мм до 6 мм.

Таблица 4. Количество штаммов ризобий, проявляющих действие.

Проанализировано 58 штаммов	Действие			
	<i>R. leguminosarum</i> VSyl9		<i>R. phaseoli</i> PVu2	
	°	●	°	●
Показали воздействие	9	15	23	10
Проявили воздействие и уколом (точка) и надосадочной жидкостью	4		7	
Показали активность во всех трех чашках	–	–	–	–

Таблица 5. Подавление роста клеток газона бактерий.

Проанализировано 58 штаммов	Действие			
	<i>R. leguminosarum</i> VSyl9		<i>R. phaseoli</i> PVu2	
	°	●	°	●
Горошек лесной (20)	1 (5%)	– (0%)	1 (5%)	– (0%)
Чина бледноватая (20)	4 (20%)	10 (50%)	8 (40%)	7 (35%)
Чина весенняя (18)	4 (22,2%)	5 (27,8%)	14 (77,8%)	3 (16,7%)

Всего было проанализировано 58 коллекционных штаммов ризобий, выделенных из дикорастущих бобовых растений Южного Урала. На газоне *R. leguminosarum* VSyl9 из 58 исследованных штаммов 15 (25,9%) показали подавление роста при действии среды, где они культивировались, а 9 (15,5%) – непосредственно живых культур ризобий. На газоне *R. phaseoli* PVu2 из 58 штаммов 10 (17,2%) при действии среды и 23

(39,6%) – культуры ризобий (таблица 5). Данные результаты показывают, что подавление роста конкурирующих бактерий штаммами ризобий достаточно распространено. В целом, при выращивании бактерий на богатых средах, больше 10% штаммов ризобий вырабатывали в среду вещества, которые подавляют рост бактерий. При нанесении на газон живой культуры, процент подавления становился незначительно выше. Это было заметно у бактерий, выделенных из чины весенней, хотя у чины бледноватой наблюдается обратная картина. Это может быть связано с тем, что иногда синтез антибактериальных соединений активируется в присутствии бактерий газона. Некоторый процент штаммов, которые синтезируют антибактериальные вещества, коррелирует в какой-то степени с их уровнем генетического разнообразия популяции бобовых растений.

3.3. Скрининг штаммов, обладающих антибактериальной активностью, на способность подавлять рост штамма *E. coli*ΔTolC, трансформированного векторной конструкцией pDualrep2

Поскольку исследованные штаммы ризобий обладали ингибирующей активностью по отношению к другим штаммам ризобий, то в данной работе был проведен скрининг бактерий для определения возможного механизма действия антимикробных соединений, используя штамм *E. coli*ΔTolC (таблица 6). Данный штамм содержит репортерную систему, которая позволяет обнаруживать два механизма действия антибактериального вещества: нарушение синтеза белка или ДНК.

Таблица 6. Проявление действия штаммов на газоне *E. coli*.

№	Штамм	Наименование в коллекции	Действие	
			<i>E.coli</i> ΔTolC	
			○	●
1	ГЛ1	Горошек лесной 20.05.08	-	±
2	ГЛ2		-	±
3	ГЛ3		-	±
4	ГЛ4		-	±

Продолжение таблицы 6.

5	ГЛ5	Горошек лесной 20.05.08	-	±
6	ГЛ6		-	±
7	ГЛ7		-	±
8	ГЛ8		-	±
9	ГЛ9		-	±
10	ГЛ10		-	±
11	ГЛ12		-	±
12	ГЛ13		-	-
13	ГЛ14		-	±
14	ГЛ15		-	-
15	ГЛ16		-	-
16	ГЛ17		-	±
17	ГЛ18		-	-
18	ГЛ19		-	±
19	ГЛ20		-	-
20	ГЛ21		-	±
21	1	Чина бледноватая (Кандрыкуль) 22.06.2009	-	±
22	2		-	±
23	3		-	±
24	4		-	±
25	5		-	±
26	6		-	±
27	7		-	±
28	8		-	±
29	9		-	±
30	10		-	±
31	11		-	±
32	12		-	±
33	13		-	±
34	14		-	±
35	15		-	±
36	16		-	±
37	17		-	±
38	18		-	±
39	19		-	±
40	22		-	±
41	5	Чина весенняя Инзер	-	-
42	6		±	±
43	7		-	-
44	8		±	±
45	9		±	±
46	10		-	±
47	12		±	±

Продолжение таблицы 6.

48	13	Чина весенняя Инзер	-	±
49	14		±	±
50	16		-	-
51	10	Чина весенняя 10.06.2008	-	-
52	11		-	-
53	12		-	-
54	13		-	-
55	14		-	±
56	15		-	±
57	16		-	-
58	17		-	-

Примечание: «°» – это точка суспензии бактерий, «◆» – это 5 мкл надосадочной жидкости; «±» – зона подавления от 1 мм до 4 мм, «±» – зона подавления от 4 мм до 6 мм.

Таблица 7. Количество штаммов, проявляющих действие.

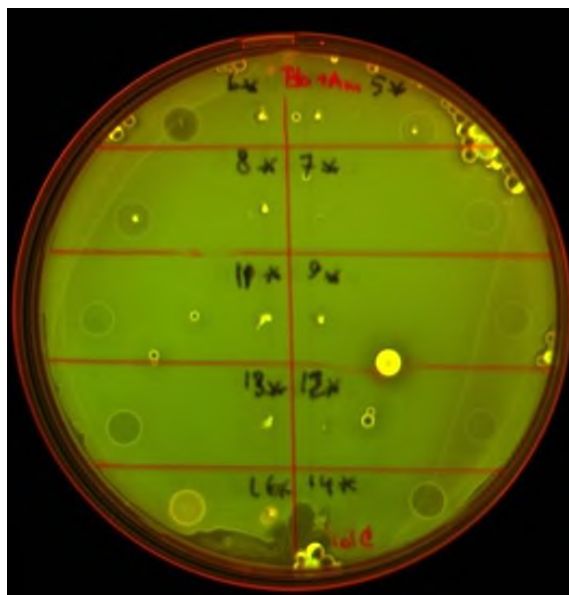
Проанализировано 58 штаммов	Действие	
	<i>E. coli</i> TolC	
	°	◆
Показали воздействие	5	44
Проявили воздействие и уколом (точка) и надосадочной жидкостью	5	
Показали активность во всех трех чашках	–	–

Таблица 8. Подавление роста клеток газона бактерий.

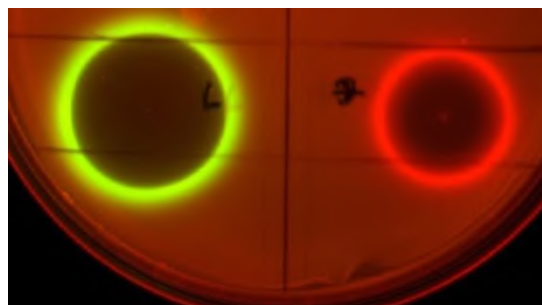
Проанализировано 58 штаммов	Действие	
	<i>E. coli</i> TolC	
	°	◆
Горошек лесной (20)	– (0%)	15 (75%)
Чина бледноватая (20)	– (0%)	20 (100%)
Чина весенняя (18)	5 (25%)	9 (45%)

При исследовании штаммов, обладающих антибактериальной активностью на способность подавлять рост штамма *E. coli*ΔTolC, трансформированного векторной конструкцией pDualrep2, было показано, что на газоне *E. coli*ΔTolC из 58 штаммов 44 (75,9%) подавляли рост при воздействии среды и 5 (8,6%) – культуры ризобий (таблица 8). TolC – это один из основных поринов, который выводит различные соединения из

клетки через внешнюю мембрану. Вследствие, этого на нем хорошо проявляется действие антибактериальных соединений в виде подавления роста газона. По данным таблицы видно, что не очень эффективным явился метод добавления живых ризобий на газон *E.coli*, возможно это связано с более быстрым ростом именно *E.coli*.



А.



Б.

Рисунок 6. Зоны подавления штаммов, выделенных из чины весенней (А) и (Б) антибиотиков левофлоксацина (ингибирует синтез ДНК) и эритромицина (ингибирует синтез белка) на штамм подложку *E.coli*ΔTolC.

На данной иллюстрации видно, что штаммы ризобий, выделенные из клубеньков растения чины весенней (*Lathyrus vernus* L. Bernh.) под номерами 6*, 13*, 14* подавляют рост контрольного штамма *E.coli*ΔTolC (рисунок 6 А). Однако, ореола вокруг зоны ингибирования зеленого цвета (ингибирование синтеза ДНК) или же красного цвета (нарушение синтеза белка) (рисунок 6 Б) у данных штаммов не наблюдалось. Это может свидетельствовать о том, что у исследованных ризобий могут быть другие механизмы подавления чужеродных бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ризобии являются бактериями, которые вступают в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями. Им для хорошей колонизации и инфицирования корней растения-хозяина нужно противостоять в конкуренции близкородственным или другим типовым бактериям, соответственно ризобии выделяют различные вещества, такие как бактериоцины, которые подавляют рост других микроорганизмов. Именно поэтому клубеньковые бактерии являются особым объектом для исследования регуляции численности бактерий и источником для поиска новых антибактериальных соединений.

В работе мы убедились, что подавление роста конкурирующих бактерий ризобиями достаточно распространенное явление. При выращивании ризобий на богатых питательных средах, из общего количества, выбранных бактерий от 5 до 50% штаммов, в зависимости от растения-хозяина, выделяли в среду антибактериальные вещества. При этом, когда на газон бактерий была внесена живая культура ризобий, процент подавления становился незначительно выше, такое явление было заметно у бактерий, выделенных из чины весенней. В целом, штаммы *R. leguminosarum* проявляют наибольшую антибактериальную активность, в сравнении с *R. phaseoli*. Процент штаммов, которые синтезируют антибактериальные вещества, в какой-то степени соотносится с уровнем генетического разнообразия микросимбионтов популяции бобового растения. При изучении штаммов, обладающих антибактериальной активностью, на способность подавлять рост штамма *E. coli*ΔTolC методом добавления живых ризобий оказался не очень эффективным, возможно это связано с более быстрым ростом именно *E. coli*.

Бактериоцины, которые продуцируют ризобии, могут играть значимую роль в пищевой промышленности для продления срока хранения продуктов, в медицине при лечении рака, также они могут в будущем

заменить антибиотики в лечении патогенов с множественной лекарственной устойчивостью.

ВЫВОДЫ

1. Ризобии *R. leguminosarum* способны к спонтанному синтезу антибактериальных соединений на богатой питательной среде УМ. Для получения бактериального газона на основе ризобияльных штаммов, подходит не дающая ослизнения белковая среда ТУ.

2. Показано, что синтез антибактериальных соединений ризобиями *R. leguminosarum* – довольно распространенное явление. До 50% симбионтов чины бледноватой, 30% чины весенней и 5% горошка лесного способны подавлять рост родственных бактерий, что в некоторой степени соотносится с уровнем генетического разнообразия микросимбионтов популяции бобового растения.

3. Штаммы, обладающие антибактериальной активностью, также подавляют рост штамма *E. coli*ΔTolC, трансформированного векторной конструкцией pDualrep2, но механизм подавления роста неясен.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаева Н.Ф. Общее представление о механизмах гетерологичного продуцирования бактериоцинов молочнокислых бактерий (обзор) //Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – №. 1-1. – С. 29-32.
2. Баймиев Ан.Х., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Гуменко Р.С., Мулдашев А.А, Чемерис А.В., Баймиев Ал.Х. Филогенетическая характеристика клубеньковых бактерий эндемичных для Южного Урала видов рода *Oxytropis* (Fabaceae) //Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – №. 2. – С. 157-167.
3. Вершинина З.Р., Лавина А.М., Чубукова О.В. Экзополисахариды *Rhizobium leguminosarum*-краткий обзор //Биомика. – 2020. – Т. 12. – №. 1. – С. 27-49.
4. Гарипова С.Р. Экологическая роль эндофитных бактерий в симбиозе с бобовыми растениями и их применение в растениеводстве //Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132. – №. 5. – С. 493-505.
5. Долгих Е.А., Кириенко А.Н., Леппянен И.В., Долгих А.В. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Сообщение II. Ауксины (обзор) //Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – №. 5. – С. 585-592.
6. Дубинина М.Н., Лыхман В.А. Влияние ризосферы почвы на ее микробиологическую активность //Эпоха науки. – 2020. – №. 21. – С. 11-14.
7. Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробиология: учеб. для вузов. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2005. – 445с.

8. Жуков В.А., Рычагова Т.С, Штарк О.Ю., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями //Экологическая генетика. – 2008. – Т. 6. – №. 4. – С. 10-12.
9. Зунг Х.Т., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В, Щербакова Е.Н. Ключевой стимулятор роста растений-ризобактерии //Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование. – 2020. – №. 3 (47). – С. 58-73.
10. Иванова К.А., Цыганов В.Е. Защитные реакции в бобово-ризобийном симбиозе: индукция и супрессия (обзор) //Сельскохозяйственная биология. – 2014. – №. 3. – С. 3-12.
11. Картыжова Л.Е., Кондрацкая И.П. Физиолого-биохимические свойства и особенности функционирования клубеньковых бактерий *Rhizobium galegae* в экстремальных //The Scientific Heritage. – 2022. – №. 96. – С. 13-26.
12. Клюкова М.С., Жуков В.А., Тихонович И.А. NCR-пептиды-растительные эффекторы, контролирующие терминальную дифференцировку клубеньковых бактерий в симбиотическую форму //Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – №. 5. – С. 869-877.
13. Кудряшов В.Л., Алексеев В.В., Фурсова Н.А. Низин и натамицин–эффективные пищевые микробиологические консерванты //Пищевая индустрия. – 2020. – №. 2 (44). – С. 67-71.
14. Курчак О.Н., Проворов Н.А., Симаров Б.В. Сравнительный анализ адаптивного потенциала популяций клубеньковых бактерий вики (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*), выделенных в регионах естественного произрастания и возделывания растений-хозяев //Генетика. – 2011. – Т. 47. – №. 4. – С. 484-491.

15. Масленникова С.Н., Шургин А.И., Чеботарь В.К., Щербаков А.В., Канарский А.В. Биоразнообразие ризосферных микроорганизмов древесных пород //Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – №. 4. – С. 193-197.
16. Мачавариани Н.Г., Терехова Л.П. Биологически активные соединения, образуемые микроорганизмами-эндофитами //Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т. 59. – №. 5-6. – С. 26-33.
17. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. I. Нерибосомальные антибиотики полипептиды // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т.56. – №. 3-4. – С. 57-68.
18. Орлова Т.И., Булгакова В.Г., Полин А.Н. Биологически активные нерибосомальные пептиды. II. Нерибосомальные пептиды различного биологического действия // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т.56. – №. 11-12. – С. 30-33.
19. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Роль горизонтального переноса генов в эволюции клубеньковых бактерий, направляемой растением-хозяином //Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130. – №. 4. – С. 336-345.
20. Рябцева М.Ю. Некоторые теоретические и экспериментальные сведения о специфических органах фиксации азота-корневых клубеньках, образующихся в результате симбиоза гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и клубеньковых бактерий (рода *Rhizobium*) //Аграрный вестник Урала. – 2009. – №. 6. – С. 41-44.
21. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т.53. – №. 1. – С. 29-37.

22. Хакимова Л.Р., Сербасева Э.Р., Лавина А.М., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Ростостимулирующая активность клубеньковых бактерий *Rhizobium leguminosarum*, выделенных из бобовых растений Южного Урала //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – №. 9 (209). – С. 96-99.
23. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. Негативная гормональная регуляция развития симбиотических клубеньков. Сообщение I. этилен (обзор) //Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – №. 3. – С. 267-277.
24. Червоткина Д.Р., Борисова А.В. Антимикробные препараты природного происхождения: обзор свойств и перспективы применения //Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2022. – Т. 12. – №. 2. – С. 254-267.
25. Широких А.А., Мерзаева О.В., Широких И.Г. Методические подходы к изучению микроорганизмов прикорневой зоны растений (обзор) //Сельскохозяйственная биология. – 2007. – №. 1. – С. 43-55.
26. Шурхно Р.А., Норина О.С., Гибадуллина Ф.С., Тагиров М.Ш. Биологическая активность ризосферы многолетних бобовых культур //Достижения науки и техники АПК. – 2007. – №. 3. – С. 16-20.
27. Ali M.A., Lou Y., Hafeez R., Li X., Hossain A., Xie T., Lin L., Li B., Yin Y., Yan J., An Q. Functional analysis and genome mining reveal high potential of biocontrol and plant growth promotion in nodule-inhabiting bacteria within *Paenibacillus polymyxa* complex //Frontiers in Microbiology. – 2021. – Т. 11. – С. 618601.
28. Borowik A., Wyszowska J., Kucharski J. Bacteria and soil enzymes supporting the valorization of forested soils //Materials. – 2022. – Т. 15. – №. 9. – С. 3287.

29. Cesa-Luna C., Alatorre-Cruz J.M., Carreno-Lopez R., Quintero-Hernandez V., Baez A. Emerging applications of bacteriocins as antimicrobials, anticancer drugs, and modulators of the gastrointestinal microbiota //Polish Journal of Microbiology. – 2021. – T. 70. – №. 2. – C. 143-159.
30. Darbandi A., Asadi A., Mahdizade Ari M., Ohadi E., Talebi M., Halaj Zadeh M., Emamie Darb A., Ghanavati R., Kakanj M. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials //Journal of Clinical Laboratory Analysis. – 2022. – T. 36. – №. 1. – C. e24093.
31. Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter, P. D. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 461.
32. Etesami H. Root nodules of legumes: a suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture //Current Research in Biotechnology. – 2022. – T. 4. – C. 78-86.
33. Han Q., Ma Q., Chen Y., Tian B., Xu L., Bai Y., Chen W., Li, X. Variation in rhizosphere microbial communities and its association with the symbiotic efficiency of rhizobia in soybean //The ISME journal. – 2020. – T. 14. – №. 8. – C. 1915-1928.
34. Hols P., Ledesma-García L., Gabant P., Mignolet J. Mobilization of microbiota commensals and their bacteriocins for therapeutics //Trends in microbiology. – 2019. – T. 27. – №. 8. – C. 690-702.
35. Jardim A.C.M., de Oliveira J. E., Alves L.D.M., Gutuzzo G.O., de Oliveira A.L.M., Rodrigues E.P. Diversity and antimicrobial potential of the culturable rhizobacteria from medicinal plant *Baccharis trimera* Less DC //Brazilian Journal of Microbiology. – 2022. – T. 53. – №. 3. – C. 1409-1424.

36. Kasimin M.E., Shamsuddin S., Molujin A.M., Sabullah M.K., Gansau J.A., Jawan R. Enterocin: Promising Biopreservative Produced by *Enterococcus* sp //Microorganisms. – 2022. – T. 10. – №. 4. – C. 684.
37. Lazcano C., Boyd E., Holmes G., Hewavitharana S., Pasulka A., Ivors K. The rhizosphere microbiome plays a role in the resistance to soil-borne pathogens and nutrient uptake of strawberry cultivars under field conditions //Scientific Reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 1-17.
38. Ling N., Wang T., Kuzyakov Y. Rhizosphere bacteriome structure and functions //Nature communications. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 836.
39. Liu F., Hewezi T., Lebeis S.L., Pantalone V., Grewal P.S., Staton, M.E. Soil indigenous microbiome and plant genotypes cooperatively modify soybean rhizosphere microbiome assembly //BMC microbiology. – 2019. – T. 19. – №. 1. – C. 1-19.
40. Mus F., Crook M.B., Garcia K., Garcia Costas A., Geddes B.A., Kouri E.D., Paramasivan P., Peters, J.W. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes //Applied and environmental microbiology. – 2016. – T. 82. – №. 13. – C. 3698-3710.
41. Niamah A.K. Structure, mode of action and application of pediocin natural antimicrobial food preservative: A review //Basrah Journal of Agricultural Sciences. – 2018. – T. 31. – №. 1. – C. 59-69.
42. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – T. 60. – №. 12. – C. 7481-7489.

43. Peñaloza Atuesta G.C., Murillo Arango W., Eras J., Oliveros D.F., Méndez Arteaga J.J. Rice-associated rhizobacteria as a source of secondary metabolites against *Burkholderia glumae* //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 11. – C. 2567.
44. Rebello S., Nathan V.K., Sindhu R., Binod P., Awasthi M.K., Pandey A. Bioengineered microbes for soil health restoration: present status and future //Bioengineered. – 2021. – T. 12. – №. 2. – C. 12839-12853.
45. Schumpp O., Deakin W.J. How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules //Trends in plant science. – 2010. – T. 15. – №. 4. – C. 189-195.
46. Siczek A., Lipiec J. Impact of faba bean-seed rhizobial inoculation on microbial activity in the rhizosphere soil during growing season //International journal of molecular sciences. – 2016. – T. 17. – №. 5. – C. 784.
47. Sousa R.M.S., Mendes L.W., Antunes J.E.L., de Souza Oliveira L.M., Sousa A.M.D.C.B., Gomes R.L.F., Lopes A.C.A., Araujo F.F., Melo M.M.V., Araujo, A.S.F. Diversity and structure of bacterial community in rhizosphere of lima bean //Applied Soil Ecology. – 2020. – T. 150. – C. 103490.
48. Stambulska U.Y., Bayliak M.M. Legume-rhizobium symbiosis: secondary metabolites, free radical processes, and effects of heavy metals //Co-Evolution of Secondary Metabolites. – 2020. – C. 291-322.
49. Travin D.Y., Watson Z.L., Metelev M., Ward F.R., Osterman I.A., Khven I.M., Khabibullina N.F., Serebryakova M., Mergaert P., Polikanov Y.S., Cate J.H.D., Severinov K. Structure of ribosome-bound azole-modified peptide phazolicin rationalizes its species-specific mode of bacterial translation inhibition //Nature communications. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 4563.
50. Yang S.C., Lin C.H., Sung C.T., Fang J.Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals //Frontiers in microbiology. – 2014. – T. 5. – C. 241.

Отчет о проверке на заимствования №1



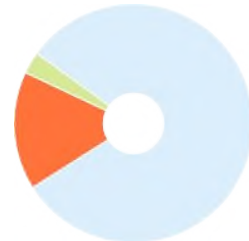
Автор: Шарафутдинова Карина Ильшатовна
Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна
Организация: Башкирский государственный медицинский университет
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11635
Начало загрузки: 21.06.2023 07:32:19
Длительность загрузки: 00:00:06
Имя исходного файла: Шарафутдинова К.И. _ ВКР.doc
Название документа: Шарафутдинова К.И. _ ВКР
Размер текста: 83 кБ
Тип документа: Выпускная квалификационная работа
Символов в тексте: 84660
Слов в тексте: 9657
Число предложений: 1130

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 21.06.2023 07:32:26
Длительность проверки: 00:01:41
Корректировка от 21.06.2023 09:08:03
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да
Проверенные разделы: основная часть с. 3-48, библиография с. 49-55
Модули поиска: ИПС Адилет, Модуль поиска "БГМУ", Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования издательства Wiley, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика*, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ	САМОЦИТИРОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
16,05%	0%	2,75%	81,2%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирование — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирование — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	13,97%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	0	1	
[02]	4,18%	3,84%	"Емцев В.Т., Мишустин Е.Н. Микробио... http://nashaucheba.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	6	7	
[03]	2,64%	2,64%	БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБО... http://elibrary.ru	16 Июл 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	5	5	
[04]	1,91%	0,71%	РОЛЬ ФИТОГОРМОНОВ В КОНТРОЛЕ ... http://elibrary.ru	30 Апр 2016	Перефразирования по eLIBRARY.RU	4	2	
[05]	1,53%	1,53%	Антимикробные препараты природн... https://elibrary.ru	12 Июл 2022	eLIBRARY.RU	8	8	Тип источника изменен с "совпадение" на "цитирование". Причина: Весь текст из источника использован правомерно.
[06]	1,37%	1,11%	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДАПТИВ... http://elibrary.ru	12 Янв 2011	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	2	
[07]	1,21%	1,21%	РОЛЬ ФИТОГОРМОНОВ В КОНТРОЛЕ ... http://elibrary.ru	30 Апр 2016	eLIBRARY.RU	4	4	Тип источника изменен с "совпадение" на "цитирование". Причина: Весь текст из источника использован правомерно.
[08]	1,05%	1,05%	Биологически активные нерибосома... http://elibrary.ru	25 Янв 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	2	2	
[09]	1,05%	1,05%	генетический контроль специфичнос... http://elibrary.ru	29 Авг 2008	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	

[10]	1,05%	0%	2008_4_12-19.pdf http://ecolgenet.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	
[11]	0,93%	0,02%	генетический контроль специфичеснос... http://elibrary.ru	29 Авг 2008	eLIBRARY.RU	1	2	
[12]	0,93%	0%	АНТИМИКРОБНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ПРИР... https://cyberleninka.ru	09 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	0,91%	0%	Азотфиксация свободноживущими м... https://studme.org	25 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	14	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	0,9%	0,62%	Роль биологического азота в азотно... http://otherreferats.allbest.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	2	3	
[15]	0,9%	0,9%	Биологически активные нерибосома... http://elibrary.ru	18 Янв 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	3	
[16]	0,89%	0,88%	ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЭНДОФИТНЫ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	3	3	
[17]	0,87%	0%	Full article (Rus) http://agrobiology.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	12	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	0,87%	0%	Роль фитогормонов в контроле разв... https://yandex.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	12	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	0,84%	0,64%	Ха, Тхи Зунг Получение биопрепарат... http://dlib.rsl.ru	23 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	1	2	
[20]	0,77%	0%	БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБО... http://elibrary.ru	16 Июл 2018	eLIBRARY.RU	0	2	
[21]	0,76%	0%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	0	16	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,72%	0%	Биологически активные нерибосома... https://cyberleninka.ru	14 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,72%	0%	Гуменко, Роман Сергеевич Получени... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	0,7%	0%	Биологически активные нерибосома... https://antibiotics-chemotherapy.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,7%	0%	Роль биологического азота в азотно... https://knowledge.allbest.ru	15 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,66%	0,66%	Физиолого-биохимические свойства ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	1	1	
[27]	0,65%	0%	Баймиев, Андрей Ханифович диссерт... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,64%	0%	Азотфиксация свободноживущими м... https://studme.org	22 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	9	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,63%	0,06%	ФГБНУ НИИНА им. Г.Ф.Гаузе - Струку... http://gause-inst.ru	26 Мая 2021	Интернет Плюс*	1	4	
[30]	0,59%	0%	НЕКОТОРЫЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСП... http://elibrary.ru	16 Дек 2016	eLIBRARY.RU	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,58%	0%	Диссертация на тему «Клубеньковые ... http://dissercat.com	27 Мар 2019	Интернет Плюс*	0	6	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,57%	0,57%	БИОРАЗНООБРАЗИЕ РИЗОСФЕРНЫХ ... http://elibrary.ru	29 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[33]	0,56%	0%	Волобуева, Ольга Гавриловна Эффект... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,55%	0%	55701 http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[35]	0,54%	0%	Биологически активные метаболиты ... https://cyberleninka.ru	16 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,53%	0%	Performance of five typical warm - seaso... https://doi.org	30 Авг 2021	Издательство Wiley	0	2	
[37]	0,53%	0%	Гарипова, Светлана Равилевна Форм... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,48%	0%	Генетический контроль специфичеснос... https://cyberleninka.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,48%	0%	НИЗИН и НАТАМИЦИН – эффективны... https://cyberleninka.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,48%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachment/an... https://mdpi-res.com	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,47%	0,04%	ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВО... https://elibrary.ru	26 Окт 2022	eLIBRARY.RU	1	1	

[42]	0,45%	0%	http://old.timacad.ru/catalog/disser/kd... http://old.timacad.ru	08 Дек 2020	Интернет Плюс*	0	8	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,45%	0,11%	Некоторые теоретические и экспери... https://cyberleninka.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	1	2	
[44]	0,44%	0%	https://gorskigau.ru/Portals/0/%D0%9D... https://gorskigau.ru	20 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,41%	0%	Маҳаллий ризобактериялар штаммл... http://diss.natlib.uz	12 Фев 2019	Коллекция НБУ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,41%	0,39%	БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РИЗ... http://cyberleninka.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[47]	0,41%	0%	Доев, Дзамболат Николаевич Оценка... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,4%	0%	http://www.scientific-heritage.com/wp-... http://scientific-heritage.com	07 Окт 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,4%	0%	Marina V. Serebryakova https://belozersky.msu.ru	07 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	1	
[50]	0,4%	0%	Диссертация на тему «Клубеньковые ... https://dissercat.com	13 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,4%	0%	https://kubsau.ru/upload/iblock/301/30... https://kubsau.ru	25 Янв 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,38%	0%	https://kemsu.ru/upload/iblock/1a2/1a... https://kemsu.ru	03 Фев 2022	Интернет Плюс*	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,38%	0%	Лаборатория молекулярной и клеточ... https://arriam.ru	07 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,37%	0%	Translation-Targeting RPPs and Where ... https://frontiersin.org	26 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	
[55]	0,36%	0%	Изучение антимикробной активност... https://cyberleninka.ru	04 Июл 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,36%	0%	Цыганов, Виктор Евгеньевич Молеку... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,35%	0%	https://bashedu.ru/sites/default/files/di... https://bashedu.ru	15 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,35%	0%	https://bioschool.pnpi.nrcki.ru/wp-cont... https://bioschool.pnpi.nrcki.ru	28 Мая 2020	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,35%	0%	https://bioschool.pnpi.nrcki.ru/wp-cont... https://bioschool.pnpi.nrcki.ru	11 Мар 2020	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,34%	0%	Diversity, Novelty, and Antimicrobial Ac... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	
[61]	0,34%	0,34%	СВЕДЕНИЯ О БАНКРОТСТВАХ	23 Дек 2018	СМИ России и СНГ	1	1	
[62]	0,32%	0%	Skoltech Center of Life Sciences Donts... https://crei.skoltech.ru	20 Ноя 2020	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,31%	0%	The Genus Enterococcus: Between Prob... https://frontiersin.org	03 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,31%	0%	Ефименко, Татьяна Александровна Ба... http://dlib.rsl.ru	22 Фев 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,31%	0%	https://gause-inst.ru/sites/default/files/... https://gause-inst.ru	25 Апр 2021	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,31%	0%	https://www.gause-inst.ru/sites/default... https://gause-inst.ru	15 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,31%	0%	«МОЛОДОЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬ: ВЫЗО... https://docplayer.ru	28 Окт 2020	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,3%	0%	Лавина, Анна Михайловна Гены-регу... http://dlib.rsl.ru	23 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[69]	0,3%	0%	Лавина, Анна Михайловна Гены-регу... http://dlib.rsl.ru	11 Окт 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[70]	0,3%	0%	Legume–rhizobium dance: an agricultur... https://doi.org	30 Сен 2021	Издательство Wiley	0	1	
[71]	0,3%	0,15%	2004_3_14-24.pdf (1/2) http://ecolgenet.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[72]	0,29%	0%	144723 http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	
[73]	0,29%	0%	144836 http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	

[74]	0,29%	0%	Кадермас, Ирина Геннадьевна Форм... http://dlib.rsl.ru	22 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	
[75]	0,28%	0%	Effects of Trichoderma harzianum biofe... https://doi.org	30 Ноя 2022	Издательство Wiley	0	1	
[76]	0,28%	0,28%	Научная конференция молодых учен... http://bibliorossica.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	1	1	
[77]	0,26%	0%	https://www.binran.ru/files/phd/Ivanov... https://binran.ru	29 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,25%	0%	Сведения об официальных оппонент... https://binran.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,25%	0%	Долгих, Елена Анатольевна Сигнальн... http://dlib.rsl.ru	14 Июл 2017	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,24%	0%	Т. 47, № 12, декабрь http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,24%	0%	Secretion dynamics of soyasaponins in ... https://doi.org	02 Мар 2022	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,24%	0%	Secretion dynamics of soyasaponins in ... https://doi.org	06 Мар 2022	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,24%	0%	Bacteriocins: Properties and potential u...	18 Янв 2022	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,23%	0%	РОЛЬ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОС... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,23%	0%	МАРКИРОВАНИЕ МИКРОСИМБИОНТ... https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,23%	0%	Вестник On-line - Архив печатного изд... http://vestnik.osu.ru	10 Мар 2019	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,23%	0%	From Microbiome to Traits: Designing S... https://frontiersin.org	26 Мая 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,23%	0%	Биотехнологии в химико-лесном ком... http://bibliorossica.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,22%	0%	The Impacts of Domestication and Bree... https://frontiersin.org	20 Мая 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	0,22%	0%	Effect of a nisin-producing lactococcal s... https://doi.org	31 Окт 2020	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[91]	0,22%	0%	Desert Microbes for Boosting Sustainab... https://frontiersin.org	25 Фев 2022	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,22%	0%	The role of rhizodeposits in shaping rhiz... https://doi.org	30 Апр 2020	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,21%	0%	Эндифиты плодов яблони. https://elibrary.ru	20 Дек 2022	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,2%	0%	Определение симбиотической актив... https://yandex.ru	21 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,2%	0%	Drought-induced senescence of Medica... https://doi.org	31 Окт 2018	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,2%	0%	Микробиология. 2017. Т. 86, № 5 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,19%	0%	Ташлицкий Вадим Неронович - польз... https://istina.msu.ru	05 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,19%	0%	Сергиев Петр Владимирович - пользо... https://istina.msu.ru	06 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,19%	0%	Antimicrobial Agents and Chemotherap... http://istina.msu.ru	07 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,19%	0%	Остерман Илья Андреевич - пользова... https://istina.msu.ru	08 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,19%	0%	Кораблина, Диана Дмитриевна Синте... http://dlib.rsl.ru	14 Июн 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,19%	0%	Овод, Артём Артурович Изучение фу... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[103]	0,19%	0%	Effect of a nisin-producing lactococcal s... https://doi.org	31 Окт 2020	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,19%	0%	Microbiology is the basis of sustainable ... https://doi.org	30 Сен 2011	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,18%	0%	142403 http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,18%	0%	Гарипова, Светлана Равиловна Форм... http://dlib.rsl.ru	16 Июн 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,17%	0%	Хакимова, Лилия Ралисовна Бактери... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,17%	0%	Куварина, Анастасия Евгеньевна Мик... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,17%	0%	Discovery of Novel Type II Bacteriocins ... https://frontiersin.org	03 Сен 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,17%	0%	58164 http://e.lanbook.com	09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,17%	0%	Ветеринарная микробиология и имм... http://studentlibrary.ru	20 Янв 2020	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,17%	0%	Косульников, Юрий Витальевич Техн... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,16%	0%	Diplom_Kozhevnikov_fazrpp_350404_2...	24 Апр 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,16%	0%	Симбиотическая азотфиксация - МИК... https://studme.org	05 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,15%	0%	Гарифуллина, Динара Вакилевна дисс... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,15%	0%	Soil Amendment With Different Maize Bi... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,15%	0%	Вигилянский, Юрий Михайлович Вли... http://dlib.rsl.ru	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0,13%	0%	Перечень рецензируемых научных и... http://ivo.garant.ru	09 Дек 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,13%	0%	Перечень рецензируемых научных и... http://ivo.garant.ru	09 Дек 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,13%	0%	Перечень ведущих рецензируемых н... http://ivo.garant.ru	20 Мар 2010	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,12%	0%	Люцерна и эспарцет: 30 вопросов от ... https://agroxxi.ru	02 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,12%	0%	КЛУБЕНЬКОВЫЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИ... https://scienceforum.ru	13 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,11%	0%	Диплом магистратура_Фандо АА	07 Июн 2023	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,11%	0%	Структурная адаптация некоторых ви... http://diss.natlib.uz	30 Апр 2017	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0,09%	0%	Potential Use of Beneficial Microorganis... https://frontiersin.org	29 Апр 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.