

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

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

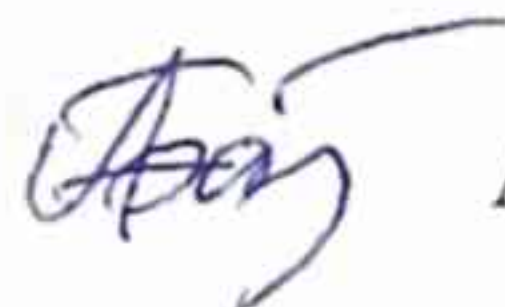
На правах рукописи

Кшир

Хасанова Надия Сагитовна

ШТАММ *RHIZOBIUM* SP. POP5, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ПЕПТИДНЫЙ
БАКТЕРИОЦИН – ФАЗОЛИЦИН

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



А.Х. Баймиев

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1. Бактериоцины	7
1.1.1 Бактериоцины грамположительных микроорганизмов	10
1.1.2. Бактериоцины грамотрицательных микроорганизмов	11
1.1.3. Пептидные бактериоцины	12
1.2. Клубеньковые бактерии	15
1.2.1. Регуляция численности бактерий в ризосфере и почве	19
1.3. Характеристика бактерий рода <i>Rhizobium</i>	23
1.4. Фазолицин	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	27
2.1. Объекты исследования	27
2.2. Методы исследования	27
2.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования клубеньковых бактерий	27
2.2.2. Оживление штаммов клубеньковых бактерий после криохранения	29
2.2.3. Получение бактериального газона	30
2.2.4. Проведение скрининга штаммов ризобий фасоли на синтез антимикробных соединений	30
2.2.5. Обработка бактерий флавоноидами	31
2.2.6. Постановка опыта с инокуляцией корней проростков фасоли ризобиями	32
2.2.7. Выделение бактерий из клубеньков	33
2.2.8. Выделение ДНК из бактерий	33
2.2.9. RAPD-анализ	33
2.2.10. Электрофорез в агарозном геле	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1. Определение оптимальных условий синтеза антибактериальных соединений штаммом <i>Rhizobium</i> sp. Por5	36

3.1.1. Влияние различных pH на продукцию штаммом <i>Rhizobium</i> sp. Pop5 антимикробных соединений	36
3.1.2. Влияние различного дрожжевого экстракта на продукцию штаммом <i>Rhizobium</i> sp. Pop5 антимикробных соединений	37
3.1.3. Влияние различных источников углеводов на продукцию штаммом <i>Rhizobium</i> sp. Pop5 антимикробных соединений	37
3.1.4. Влияние наличия других бактерий и их лизатов на продукцию штаммом <i>Rhizobium</i> sp. Pop5 антимикробных соединений	39
3.1.5. Влияние флавоноидов на продукцию штаммом <i>Rhizobium</i> sp. Pop5 антимикробных соединений	40
3.2. Скрининг штаммов ризобий фасоли из коллекции «Симбионт» на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий	43
3.3. Оценка способности мексиканского штамма <i>Rhizobium</i> sp. Pop5 формировать клубеньки при конкурентном заражении семян фасоли обыкновенной с местными штаммами ризобий.	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
ВЫВОДЫ	49
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	51

ВВЕДЕНИЕ

Клубеньковые бактерии – группа почвенных бактерий порядка *Rhizobiales*. Как правило, корневые и стеблевые клубеньковые бактерии симбиотически образуют клубеньки и фиксируют азот вместе с некоторыми фасолевыми растениями, обеспечивая источник азота для растений и снижая потребность в искусственных удобрениях, которые могут быть дорогими и вызывать экологические проблемы.

Устойчивость к высоким уровням засоления, а также выживаемость и устойчивость в суровых условиях пустыни делают эти ризобии очень ценным инокулятом для повышения продуктивности бобовых растений, выращиваемых в экстремальных условиях.

Актуальность темы.

Симбиотические азотфиксирующие бактерии (ризобии) конкурируют за образование клубеньков у растений-хозяев, используя различные механизмы, включая продукцию антимикробных соединений. Одним из таких соединений является бактериоцин – фазолицин, который синтезируется штаммом *Rhizobium* sp. Pop5.

Данный штамм был выделен из клубеньков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), произрастающей в Мексике в тропическом лесу в регионе Лос Тукстлас.

Фазолицин представляет собой пептид, который блокирует работу рибосом лишь некоторых бактерий порядка *Rhizobiales*. Поскольку данное антимикробное соединение обладает таким избирательным действием, представляется интересным оценить его влияние на рост штаммов ризобий, изолированных из клубеньков бобовых растений, произрастающих на территории Республики Башкортостан.

Целью данной работы является исследовать способность мексиканского штамма *Rhizobium* sp. Pop5, продуцирующего пептидный бактериоцин – фазолицин, подавлять рост ризобий фасоли, изолированных из почв Республики Башкортостан.

Задачи:

1. Отработать методику культивирования бактерий штамма *Rhizobium* sp. Pop5 для определения оптимальных условий синтеза антибактериальных соединений.
2. Провести скрининг штаммов ризобий фасоли из коллекции «Симбионт» на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий.
3. Оценить подавление роста клубеньковых бакетрий между местными штаммами бактерий фасоли и мексиканским штаммом *Rhizobium* sp. Pop5.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактериоцины

В настоящее время возникновение и распространение стойкости бактерий к противомикробным препаратам является проблемой здравоохранения и экономики. Для решения этой проблемы ведутся исследования и разработки новых антимикробных средств. Среди различных изученных подходов бактериоцины представляются многообещающей возможностью. Бактериоцины – большое семейство секретируемых бактериями пептидов, обладающих антимикробной активностью и действующих против других штаммов того же вида или близкородственных видов. Бактериоцины могут продуцировать как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Первый бактериоцин был распознан в 1925 году [17] и в последующем, позволил развить большой исследовательский сектор, которые состояли из множественных работ, направленных на открытие новых антимикробных соединений микробного происхождения в последующие десятилетия. Эти природные синтезированные рибосомами пептиды производятся бактериями, обитающими в конкурентной полимикробной среде, и используются для уничтожения иных видов бактерий, особенно близкородственных [18].

Каковы же источники бактериоцинов? В настоящее время, когда проблема устойчивости к антибиотикам становится все более актуальной, антимикробные пептиды, как природные антибиотики, привлекают все большее внимание исследователей. Они являются уникальными веществами, вырабатываемыми разными организмами, такими как микроорганизмы, млекопитающие, растения и насекомые. Бактериоцин-продуцирующие бактерии могут быть извлечены из самых разных источников - воды, почвы, кишечника животных и пищевых продуктов, которые на данный момент рассматриваются как нетрадиционные. Вместе

с тем, желудочно-кишечный тракт человека долгое время считался обычным источником продуцентов бактериоцина. Однако в последние годы исследователям заинтересовало изучение нетрадиционных источников, особенно пищевых продуктов и животных. Для проведения подобных исследований используются различные методы, например, с помощью изоляции и идентификации отдельных микроорганизмов из них получают бактериоцины. Важной задачей также является определение антибактериальной активности пептидов, что делает возможным изучение их применения в качестве антибиотиков. Полученные результаты исследований могут быть полезны при разработке новых методов производства и использования бактериоцинов, эффективных средств борьбы с инфекционными заболеваниями. Бактерии, продуцирующие бактериоцин в ЖКТ, включают лактобациллу, энтерококк, стрептококк и стафилококк. Эти бактерии могут помочь коже служить первой линией защиты организма от патогенов. В дополнение к ингибированию роста других бактерий, эти бактериоцины в качестве молекул-медиаторов способны помогать иммунной системе [24].

Могут ли быть бактериоцины, лучшей заменой антибактериальной терапии, насколько известно, антибиотики играют важную роль в профилактике и лечении заболеваний у животных и людей. В дополнение к побочным эффектам некоторых антибиотиков, появление устойчивых к антибиотикам штаммов с МЛУ (множественной лекарственной устойчивостью) и ШЛУ (широкой лекарственной устойчивостью) в последнее время стало серьезной проблемой. По оценкам, к 2060 году для преодоления проблемы устойчивости к антибиотикам потребуется не менее 20 новых антибиотиков, в то время как разработка новых антибиотиков является трудоемкой процедурой. Поэтому необходимо разработать новые стратегии лечения, которые могли бы устранить устойчивые к антибиотикам микроорганизмы [13]. Одной из стратегий является использование антимикробных пептидов для достижения этой

цели. Бактериоцин считается подходящим противомикробным пептидом из-за его термостабильности и высокой эффективности при наномолекулярных размерах. В дополнение к иммунной системе бактериоцины способны воздействовать на другие бактерии посредством конкуренции в колонизации. Исследователи ищут антипатогенные бактериоцины, которые столь же эффективны, как и антибактериальная терапия. Было доказано, что бактериоцины обладают преимуществами перед антибиотиками [22]. Бактериоцины синтезируются рибосомно и считаются первичными метаболитами, в то время как антибиотики являются разновидностью вторичных метаболитов. Эта особенность позволяет исследователям разрабатывать новые бактериоцины с более эффективными возможностями, используя биоинженерные методы, основанные на способах синтеза бактериоцинов. В отличие от бактерий, продуцирующих антибиотики, бактериоцины не ингибируются противомикробными агентами. Доказана активность бактериоцинов в отношении штаммов, устойчивых к лекарствам, внутрибольничных инфекций, инфекций дыхательных путей, кожных заболеваний, стоматологических инфекций, вагиноза и туберкулеза [12]. Результаты исследований описывают бактериоцины в качестве добавок к антибиотикам из-за их высокой стабильности, отсутствия побочных эффектов и способности вызывать синергический эффект. В сочетании с антибиотиками бактериоцины действуют синергически; они не только повышают эффективность антибиотиков и предотвращают появление устойчивых к антибиотикам видов, но и уменьшают побочные эффекты антибиотиков за счет снижения концентрации антибиотиков, необходимых для уничтожения бактерий. В настоящее время терапевтическую эффективность бактериоцинов можно повысить путем разработки инженерных бактериоцинов; это требуются методы биологической и химической модификации и дальнейшие исследования [26].

Классификация бактериоцинов очень обширна и зависит от множество факторов, но есть главное различие, это тип продуцирующего организма: грамположительный или грамотрицательный [25].

1.1.1 Бактериоцины грамположительных микроорганизмов

Бактериоцины, продуцируемые грамположительными бактериями в настоящее время делятся на 4 класса. Класс I также известны как лантибиотики и включает бактериоцины малого размера и модифицированные бактериоцины. Особенностью этой группы является наличие необычных аминокислот, таких как дегидратированные аминокислоты, лантионин и 3-метиллантионин, образующих множественные кольцевые структуры и придающих структурную стабильность к нагреванию. Механизм воздействия данного класса связан с ингибированием специфических ферментов, которые нужны для бактерий-мишеней [25].

Класс II включает термостабильные, минимально модифицированные бактериоцины. Как бактериоцины класса I, эти пептиды также термостабильны и малы по размеру и в основном индуцируют дестабилизацию и проницаемость бактериальных мембран или вызывают образование пор в мембране [25,16].

Класс III включает более крупные, термолабильные бактериоцины. В эту группу включены бактериоцины, такие как зооцин A, лизотафин или гельветицин J и V. Эти бактериоцины обладают антибактериальной активностью, связанной с ферментативной активностью (например, эндопептидазы), приводящей к разрушению клеточной стенки бактерий [25,16].

Бактериоцины IV класса определяются их структурой, содержащей липидные или углеводные компоненты, такие как плантарицин S или лейконоцин S, которые разрушают мембрану бактериальных клеток. Эта структурная особенность делает эти молекулы чувствительными к

нескольким ферментам (например, гликолитическим или липолитическим ферментам) [25].

Таким образом, бактериоцины грамположительных бактерий так же многочисленны и даже более разнообразны, чем те, которые содержатся в грамотрицательных бактериях. Бактериоцинам грамположительных бактерий в целом и лантибиотикам, в частности, необходимо больше генов для их производства, нежели у грамотрицательных бактерий. Бактериоцинов грамположительных бактерий ограничены для уничтожения иных грамположительных бактерий [16].

1.1.2. Бактериоцины грамотрицательных микроорганизмов

Бактериоцины грамотрицательных бактерий можно разделить на три группы: пептидные бактериоцины, колициноподобные бактериоцины и тайлоцины. В настоящее время известно об различных классах бактериоцинов, и одним из них являются колицины - пептиды с молекулярной массой более 10 кДа, которые продуцируются *E. coli*. Изучение колицинов является важной задачей в области молекулярной биологии, поскольку они представляют интересные объекты для исследования механизмов действия бактериоцинов и их функциональной эволюции. Колицины могут быть разделены на два типа механизма действия: (i) колицины А, В, Е1, Ia, Ib, К и 5 могут образовывать поры в клеточной стенке бактерий, (ii) колицины от Е2 до Е9 способны деградировать нуклеиновые кислоты, такие как днк-азы, РНКазы или тРНАзы. Эти пептиды уже десятилетиями использовались для изучения структуры бактериоцинов и их функциональной эволюции, и считается, что их изучение может привести к разработке новых методов борьбы с бактериальными инфекциями. Следовательно, изучение колицинов в настоящее время является важной задачей для молекулярной биологии и медицины [16].

Ко второй группе относятся колициноподобные бактериоцины, которые вырабатываются другими бактериями (например, *Klebsiella* spp.: клебицины; *P. aeruginosa*: S-пиоцины), но по структуре, размеру и функциям все еще схожи с бактериоцинами, продуцируемыми *E. coli*. Что касается колицинов, то их антимикробное действие может быть обусловлено образованием пор или активностью нуклеазы [16].

Микроцины представляют третью группу и объединяют небольшие пептиды (<10 кДа). Можно определить два подкласса: (i) Подкласс I представляет собой посттрансляционно модифицированные бактериоцины с молекулярной массой менее 5 кДа и (ii) Подкласс II представляет собой немодифицированные или минимально модифицированные пептиды с более высокой молекулярной массой в диапазоне от 5 до 10 кДа. Микроцины взаимодействуют с несколькими разнообразными клеточными мишенями, приводя к различным способам действия, таким как разрушение мембраны или ингибирование жизненно важных ферментативных функций, таких как АТФ-синтазный комплекс, РНК-полимераза, ДНК-гираза (например, микроцин В17) или аспартил-т РНК синтетаза (например, микроцин С) [16].

1.1.3. Пептидные бактериоцины

Пептидные бактериоцины – это класс антимикробных пептидов, которые производятся некоторыми бактериями и используются для уничтожения конкурирующих микроорганизмов. В отличие от антибиотиков, которые производятся грибами и используются для борьбы с бактериями, бактериоцины производятся бактериями и могут быть направлены против других бактерий [4].

В статье Васильченко А.С. были рассмотрены пептидные бактериоцины, также была дана оценка морфо-функциональным изменениям клеток микроорганизмов под действием различных биофакторов, которые можно обнаружить с помощью современных

аналитических методов. В этой связи, целью статьи было определение влияния очищенных метаболитов энтерококков на некоторые параметры грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [4].

Многие виды бактерий, включая некоторые штаммы *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Escherichia coli*, известны своей способностью производить пептидные бактериоцины. Исследования в этой области проводятся многими лабораториями и институтами по всему миру [4].

Некоторые исследования нацелены на поиск новых пептидных бактериоцинов, которые могут использоваться в качестве антибиотиков для борьбы с инфекционными заболеваниями, вызванными различными видами бактерий. В других исследованиях изучаются механизмы действия пептидных бактериоцинов и их взаимодействие с целевыми бактериями.

Одним из примеров исследования пептидных бактериоцинов является работа, опубликованная в журнале "Nature" в 2015 году.

Исследователи из университета Рокфеллера обнаружили новый пептидный бактериоцин, который они назвали "универсальным бактериоцином". Он был способен уничтожать широкий спектр бактерий, включая патогены, такие как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*.

Другие исследования сфокусированы на изучении механизмов резистентности к пептидным бактериоцинам, которые развиваются у некоторых видов бактерий. Например, исследование, опубликованное в журнале "Antimicrobial Agents and Chemotherapy" в 2016 году, показало, что некоторые штаммы *Streptococcus pneumoniae* могут вырабатывать пептидазы, которые расщепляют пептидные бактериоцины, делая их бесполезными.

Также проводятся исследования в области использования пептидных бактериоцинов в сельском хозяйстве.

Среди пептидных бактериоцинов можно выделить несколько типов в зависимости от их структуры и механизма действия. Некоторые из них могут быть найдены у различных видов бактерий, включая клубеньковые бактерии.

Например, пептидный бактериоцин типа *Nisin A* был обнаружен в некоторых штаммах родов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*. Этот бактериоцин производится некоторыми бактериями как средство защиты от конкурирующих микроорганизмов. Он способен убивать другие бактерии путем разрушения их клеточной мембраны [9].

Еще один тип пептидных бактериоцинов, которые могут быть найдены у клубеньковых бактерий, — это пептиды типа *bacteriocin 42a*, которые обнаружены в *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Этот пептидный бактериоцин имеет антимикробное действие и может быть использован для борьбы с другими микроорганизмами [2].

В целом, исследования по поиску пептидных бактериоцинов у различных видов бактерий, в том числе клубеньковых, продолжаются, и некоторые из них могут быть использованы в будущем для разработки новых методов борьбы с патогенными бактериями или увеличения урожайности растений.

У многих видов ризобий были обнаружены гены, кодирующие пептидные бактериоцины, и было показано, что они способны производить и выделять эти бактериоцины. Например, у *Rhizobium leguminosarum* был обнаружен ген, кодирующий бактериоцин *legiocin*, который проявляет активность против некоторых близкородственных штаммов ризобий. У других видов ризобий также были обнаружены гены, кодирующие пептидные бактериоцины, в том числе у *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* и других [9][4].

Интересно отметить, что некоторые виды растений, такие как клевер, альфа-альфа и соя, также могут производить пептидные бактериоцины, которые взаимодействуют со специфическими штаммами ризобий,

способствуя их установлению в корневых клубеньках и образованию азотфиксирующих симбиотических союзов [9].

1.2. Клубеньковые бактерии

Интерес к этим бактериям со стороны исследователей связан, с одной стороны, сельскохозяйственной значимостью симбиотической азотфиксации и необходимостью разработки генетических методов селекции и конструирования хозяйственно-ценных штаммов ризобий, инокуляция которыми позволит получить высокие урожаи бобовых культур без использования дорогостоящих и экологически небезопасных азотных удобрений [9] а с другой - использованием клубеньковых бактерий как модельного объекта для изучения биологии взаимодействия микроорганизмов с высшими растениями, генетического контроля и эволюции симбиотических систем [9].

Одной из актуальных задач современной биотехнологии является исследование генетических ресурсов клубеньковых бактерий, особенно естественных природных популяций, где наиболее эффективным подходом для этих исследований является анализ их генетического разнообразия, результатом которого может быть понимание процессов возникновения новых генотипов за счет мутаций, рекомбинаций, горизонтального переноса генов. В настоящее время для характеристики ризобий широко используются различные молекулярно-генетические методы. Преимущество этих методов состоит в том, что они позволяют получать стабильные характеристики, независимые от физиологического статуса микроорганизма [1].

Значение таких исследований велико, поскольку они могут позволить выявить наиболее удачные комбинации геномов ризобий, которые могут быть использованы в качестве основы для направленного генетического конструирования штаммов, перспективных для практики [1].

Рациональное использование свойств аборигенных популяций ризобий, в перспективе, несомненно, является важным элементом биологизации земледелия и создания адаптивно-интенсивной стратегии растениеводства не только бобовых культур, но за счет использования ассоциативного симбиоза и других сельскохозяйственно-значимых растений [1].

Клубеньковые бактерии – это группа грамотрицательных бактерий, способных образовывать симбиотические отношения с растениями, обеспечивая их азотным питанием. Они получили свое название благодаря способности формировать клубеньки на корнях бобовых растений, таких как горох, фасоль, соя и других.

Клубеньковые бактерии (*Rhizobia*) относятся к роду *Rhizobium* в семействе *Rhizobiaceae*. Некоторые из наиболее известных родов клубеньковых бактерий включают *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* и *Azorhizobium*. Кроме того, также известны и другие виды бактерий, которые способны образовывать клубеньки на корнях растений, например, *Frankia*, которые образуют клубеньки на корнях лесных деревьев, таких как ель, сосна и дуб [2].

Клубеньковые бактерии имеют специализированный органелл, называемый азотфиксирующим комплексом, который позволяет им фиксировать атмосферный азот и превращать его в нитраты, доступные для поглощения растениями. Этот процесс позволяет существенно повысить плодородие почвы и увеличить урожайность культур.

Клубеньковые бактерии также способны синтезировать растительные гормоны, такие как ауксины и цитокинины, которые участвуют в регуляции роста и развития растений. Кроме того, клубеньковые бактерии могут взаимодействовать с другими микроорганизмами, такими как грибы и бактерии, в рамках сложных экосистем почвы, влияя на их состав и функционирование. Клубеньковые

бактерии играют важную роль в поддержании экологического баланса в почве и повышении урожайности сельскохозяйственных культур [6].

Клубеньковые бактерии могут обитать в почве и образовывать симбиотические ассоциации с корневыми системами растений. Они являются важными компонентами биологического азотфиксации, процесса, при котором атмосферный азот превращается в органический азот, доступный растениям. Клубеньковые бактерии способны фиксировать атмосферный азот в виде аммиака, который может использоваться растениями для синтеза белков и других органических соединений [5].

Клубеньковые бактерии могут находиться в почве в свободной форме, где они могут переживать в условиях анаэробности, либо находиться в симбиотических отношениях с растениями. В таких отношениях клубеньковые бактерии образуют на корнях растений специальные образования - клубеньки, где происходит биологическая фиксация азота.

Клубеньковые бактерии имеют разнообразные морфологические, физиологические и генетические свойства. Некоторые из них способны синтезировать фитогормоны, такие как ауксины и цитокинины, которые способствуют росту и развитию растений [6].

Важное значение клубеньковых бактерий заключается в том, что они улучшают плодородие почвы и способствуют сокращению использования минеральных удобрений, что особенно актуально в условиях экологического кризиса и стремления к устойчивому развитию. Клубеньковые бактерии широко используются в сельском хозяйстве и являются важными объектами для исследования в области биологии растений и микробиологии [1][6].

Клубеньковые бактерии находятся в симбиозе с многими видами растений, включая бобовые, как соя, горох, фасоль, арахис, и др. Ризобактерии способны фиксировать азот из воздуха в почве, превращая его в доступную форму для растений, что существенно повышает

урожайность и качество урожая. Кроме того, они также способны продуцировать различные ростовые стимуляторы и биологически активные вещества, которые улучшают здоровье растений и повышают их устойчивость к болезням и стрессовым условиям [5].

Ризобактерии взаимодействуют с растениями через особые клетки на корневой системе, называемые клубеньки. Бактерии входят в эти клетки и образуют с ними симбиотическую связь, обмениваясь питательными веществами и азотом. Растения в свою очередь предоставляют бактериям углеводы, необходимые для их роста и развития. Таким образом, ризобактерии и растения взаимодействуют взаимовыгодно, обеспечивая рост и процветание друг друга [10].

Таким образом, клубеньковые бактерии вступают во взаимодействие с различными организмами, включая растения, животных и другие микроорганизмы. Основным объектом взаимодействия клубеньковых бактерий являются корни растений, где они образуют симбиотические ассоциации с растениями, обеспечивая фиксацию атмосферного азота и его превращение в доступные формы для растений.

Взаимодействие клубеньковых бактерий с растениями происходит по следующей схеме:

- Клубеньковые бактерии распознают химические сигналы, выделяемые растительными клетками.
- Клубеньковые бактерии производят сигнальные молекулы, которые стимулируют развитие корней растений.
- Растения выделяют вещества, привлекающие клубеньковые бактерии в корневую систему.
- Клубеньковые бактерии колонизируют корни растений, образуя клубеньки - специализированные органы, где происходит фиксация азота.
- Клубеньковые бактерии передают фиксированный азот растениям, получая взамен углеводы и другие питательные вещества.

- Кроме того, клубеньковые бактерии могут взаимодействовать с другими микроорганизмами, в том числе с другими видами бактерий и грибами. Некоторые клубеньковые бактерии могут также проявлять антагонистическое действие по отношению к патогенным бактериям и грибам, выделяя антибиотики и другие бактериоцины.

1.2.1. Регуляция численности бактерий в ризосфере и почве

Изучение проблемы выживания клубеньковых бактерий и ризобий в ризосфере и почве является активной областью исследований в микробиологии и почвоведении. В настоящее время существует множество исследований, посвященных этой теме, и ведется постоянная работа над изучением механизмов регуляции численности клубеньковых бактерий и ризобий в почве.

Среди авторов, изучающих эту проблему, можно выделить следующих исследователей:

- Диссертация Бершовой О.И. посвящена влиянию микроэлементов на микроорганизмы ризосферы сельскохозяйственных растений. В работе исследовалось взаимодействие растений с микроорганизмами, в том числе с клубеньковыми бактериями и ризобиями, и их ответ на различные концентрации микроэлементов в почве [2].

- В статье Долматовой Е.С. также изучены клубеньковые азотфиксирующие бактерии, исследуется регуляция численности бактерий в ризосфере и/или почве и за счет чего удается им выживать.

- В статье Феоктистовой Н.В. Ризосферные бактерии, произведен литературный обзор, который посвящен анализу современных данных литературы по ризосферным бактериям и их роли в жизнедеятельности растений. Охарактеризована структура ризосферы, показана роль растений как центров формирования микробных сообществ, приведены данные о таксономической принадлежности основных групп микроорганизмов, населяющих ризосферу. Рассмотрены ассоциативные взаимоотношения

ризобактерий с растением-партнером и современная концепция голобионта как совокупности организма растения и ассоциированных с ним микроорганизмов. Подробно обсуждается роль ризобактерий в процессах азотфиксации. Представлены механизмы прямой стимуляции роста растений посредством синтеза фитогормонов, улучшения фосфорного и азотного питания и повышения стрессоустойчивости, а также опосредованной стимуляции посредством антагонизма в отношении фитопатогенных микроорганизмов. Обсуждаются критерии отбора ризобактерий для практических целей [10].

Все авторы в своих исследованиях пришли к единому мнению о том, что клубеньковые бактерии и ризобии выживают в ризосфере и почве благодаря различным стратегиям, таким как адаптация к условиям окружающей среды, использование доступных ресурсов, эффективное взаимодействие с растениями-хозяевами и другими микроорганизмами, а также способность к образованию биологических ассоциаций с растениями.

Клубеньковые бактерии, включая ризобии, являются азотфиксирующими микроорганизмами, способными установить специфические взаимодействия с растительными хозяевами и обеспечивать им доступ к азоту в форме аммиака. Регуляция численности клубеньковых бактерий в ризосфере и почве является важным фактором, который влияет на их способность к азотфиксации и взаимодействию с растительными хозяевами [10.]

Одной из стратегий, которые помогают клубеньковым бактериям выживать в ризосфере и почве, является адаптация к условиям окружающей среды. Например, клубеньковые бактерии могут изменять свой метаболизм в зависимости от наличия азота и других питательных веществ в почве. Кроме того, они могут образовывать биопленки на корневой поверхности растений, что помогает им устойчиво существовать в ризосфере и конкурировать с другими микроорганизмами. Еще одной важной стратегией для клубеньковых бактерий является симбиотическое

взаимодействие с растительными хозяевами. Ризобии способны взаимодействовать с растениями, образуя клубеньки на корнях, что обеспечивает им доступ к азоту и другим питательным веществам, необходимым для их роста и развития [10].

Кроме того, регуляция численности клубеньковых бактерий в почве и ризосфере может быть связана с факторами, такими как наличие кислорода, pH, температура и наличие конкурирующих микроорганизмов. Например, низкий уровень кислорода может способствовать росту азотфиксирующих бактерий, так как они способны к анаэробному дыханию.

В целом, регуляция численности клубеньковых бактерий в ризосфере и почве зависит от многих факторов и стратегий, которые позволяют им выживать и конкурировать с другими микроорганизмами в сложной экосистеме почвы.

Литературные данные указывают на несколько стратегий, используемых клубеньковыми бактериями для регуляции своей численности в ризосфере и почве.

Одной из таких стратегий является способность клубеньковых бактерий к адаптации к различным условиям окружающей среды, таким как наличие питательных веществ и конкурентов. Клубеньковые бактерии проявляют гибкость и могут переключаться на использование различных источников питания, в зависимости от того, какие вещества доступны в почве [8]

Еще одной важной стратегией является симбиоз с растениями-хозяевами, что позволяет клубеньковым бактериям получать необходимые питательные вещества от корней растений, в обмен на азот, который они фиксируют из атмосферы. В этом случае, численность клубеньковых бактерий регулируется не только наличием питательных веществ, но и эффективностью симбиотического взаимодействия с растениями-хозяевами [9].

Также клубеньковые бактерии могут выделять антибиотики и бактериоцины, которые подавляют рост конкурирующих микроорганизмов в почве. Это позволяет им сократить конкуренцию за доступные ресурсы и увеличить свою численность [10].

Наконец, клубеньковые бактерии способны образовывать пленки, что позволяет им защищаться от внешних факторов и конкурентов в ризосфере и почве. Такие пленки могут защищать клубеньковые бактерии от деградации и позволяют им сохранять свою активность в течение длительного времени [9].

В целом, регуляция численности клубеньковых бактерий в ризосфере и почве является сложным процессом, который зависит от многих факторов и стратегий. Успех клубеньковых бактерий в выживании и конкуренции с другими микроорганизмами в почве зависит от их способности адаптироваться к различным условиям, использовать доступные ресурсы и эффективно взаимодействовать с растениями-хозяевами и другими микроорганизмами в ризосфере [10.]

Одним из ключевых факторов, влияющих на регуляцию численности клубеньковых бактерий, является наличие или отсутствие подходящих растений-хозяев в ризосфере. Клубеньковые бактерии симбиотически взаимодействуют с растениями, образуя корневые клубеньки, где они фиксируют атмосферный азот и передают его в доступной форме растению. Большинство клубеньковых бактерий предпочитают определенные виды растений и могут быть селекционированы для использования в качестве биологических удобрений [6].

Кроме того, численность клубеньковых бактерий также зависит от наличия питательных веществ и источников углерода в почве. Клубеньковые бактерии используют различные стратегии, чтобы обеспечить себя необходимыми питательными веществами, включая симбиоз с другими микроорганизмами, например, грибами, или конкуренцию с другими бактериями за доступные ресурсы.

Кроме того, клубеньковые бактерии способны регулировать свою численность за счет механизмов, таких как адгезия, хемотаксис и колонизация различных микрорекологических ниш в ризосфере [10]. Например, они могут образовывать биопленки на корневой поверхности растений, что обеспечивает защиту от конкуренции с другими микроорганизмами и улучшает доступ к питательным веществам.

Таким образом, успешная регуляция численности клубеньковых бактерий в ризосфере и почве зависит от их способности адаптироваться к изменяющимся условиям, использовать доступные ресурсы и эффективно взаимодействовать с другими микроорганизмами и растениями-хозяевами в сложной экосистеме почвы.

1.3. Характеристика бактерий рода *Rhizobium*

Создание искусственных азотфиксирующих ассоциаций культурных растений с эндофитными микроорганизмами, которые выделены из природных симбиозов, является относительно новым направлением в биоинженерии симбиотических систем. Клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, фиксирующие азот в симбиозе с бобовыми растениями, могут также выступать и в качестве ассоциативных микросимбионтов для многих экономически ценных небобовых культур, таких как рис, кукуруза, пшеница, рапс, подсолнечник и т. д. Эти бактерии способны колонизировать корневую систему и повышать урожайность растений, выделяя ростостимулирующие вещества и защищая от фитопатогенов. Как показали исследования последних лет, ризобии принимают активное участие в усвоении растениями труднорастворимых соединений фосфора и даже, проникая в надземную часть растения, могут усиливать процесс фотосинтеза [3][17]. Поэтому получение искусственных симбиотических ассоциаций этих бактерий является одним из наиболее перспективных направлений на пути создания экологически ориентированного сельского хозяйства. На сегодняшний день уже выделены штаммы *Rhizobium*,

которые успешно колонизируют в природе корни небобовых растений. Например, показано, что наиболее перспективными штаммами для создания азотфиксирующих ассоциаций риса являются ризобии клевера *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R4, [17] так как эти бактерии способны колонизировать корни и заселять межклетники, способствуя увеличению урожая. В случае кукурузы и латука в качестве подобного штамма можно использовать ризобии фасоли *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* P31 и R1, которые успешно колонизируют корни этих растений в почве [1].

Вместе с тем, следует отметить, что эти процессы неконтролируемы, и в естественных условиях, к сожалению, ризосферные бактерии с полезными признаками не выдерживают конкуренции и вытесняются более агрессивными бактериями, зачастую обладающими фитопатогенными свойствами. Задача исследователей состоит в том, чтобы придать растениям способность контролировать микрофлору своей ризосферы [1].

Лектины бобовых растений – секретируемые белки, способные считывать и избирательно связывать разнообразные углеводы. Благодаря субъединичной структуре лектины являются би-(тетра-)валентными и тем самым способны избирательно связывать «свои» бактерии между собой и адгезировать их на поверхность корней бобовых растений, способствуя тем самым прикреплению клубеньковых бактерий к своему макросимбионту. Отсюда, трансгенные растения, синтезирующие лектины обусловленных бобовых растений, станут способны соединять их микросимбионтов к своим корням. Применение подобной стратегии дает ключ к конструированию «искусственной ризосферы», специфически колонизируемой только теми микробами, которые выполняют полезные для растений трофические, ростостимулирующие и/или защитные функции, а использование лектинов бобовых растений в качестве трансгенов может стать важным шагом к получению стабильных

ассоциаций экономически ценных несимбиотрофных видов растений с ризобиями [1].

1.4. Фазолицин

Бактерия, продуцирующая фазолицин, принадлежит к роду *Rhizobium* и еще не описана. Она была найдена в тропическом лесу Лос Тукстлас на юге штата Веракрус в почве и корнях дикой фасоли *Phaseolus vulgaris*. Отсюда происходит и название антибиотика – фазолицин. Как и другие ризобии, производящий фазолицин микроб образует клубеньки на корнях бобовых растений и обеспечивает их азотом, заставляя расти более устойчиво. Но в отличие от других бактерий этого рода, он также защищает растения от патогенных микробов, чувствительных к фазолицину [20].

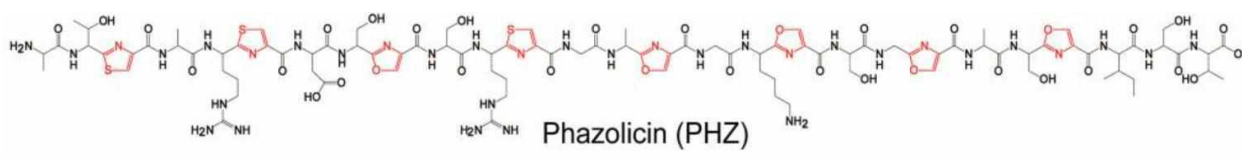


Рисунок 1. Структура фазолицина.

Частота спонтанных мутантов, устойчивых к PHZ, у *Sinorhizobium meliloti* ниже предела обнаружения. Было обнаружено, что PHZ может проникать в клетки *S. meliloti* через два различных разнородных пептидных транспортера, VasA и YejABEF, которые принадлежат к семействам переносчиков SLiPT (SbmA-подобный пептидный транспортер) и ABC (АТФ-связывающая кассета) соответственно. Режим двойного поглощения объясняет отсутствие наблюдаемого приобретения устойчивости, поскольку для устойчивости к PHZ необходима одновременная инактивация обоих транспортеров. Поскольку как VasA, так и YejABEF необходимы для развития функционального симбиоза *S. meliloti* с бобовыми растениями, маловероятное приобретение устойчивости к PHZ через инактивацию этих транспортеров еще более

неблагоприятно. Полногеномное транспозонное секвенирование не выявило дополнительных генов, которые могут обеспечить сильную устойчивость к PHZ при инактивации. Однако было обнаружено, что капсульный полисахарид KPS, новый предполагаемый полисахарид оболочки PPP (PHZ-защитающий полисахарид), а также пептидогликановый слой совместно вносят вклад в чувствительность *S. meliloti* к PHZ, скорее всего, служащие барьерами, которые уменьшают количество PHZ, транспортируемого внутри клетки [28].

Многие бактерии вырабатывают антимикробные пептиды для устранения конкурентов и создания эксклюзивной ниши. Эти пептиды действуют либо путем разрушения мембран, либо путем ингибирования важнейших внутриклеточных процессов. Ахиллесовой пятой последнего типа противомикробных препаратов является их зависимость от транспортеров для проникновения в чувствительные клетки. Инактивация транспортера приводит к устойчивости. Было доказано, что пептид, нацеленный на ризобияльные рибосомы, фазолицин (PHZ), использует два разных транспортера, VacA и YejABEF, для проникновения в клетки симбиотической бактерии *Sinorhizobium meliloti*. Этот режим двойного проникновения значительно снижает вероятность появления устойчивых к PHZ мутантов. Поскольку эти переносчики также имеют решающее значение для симбиотических ассоциаций *S. meliloti* с растениями-хозяевами, их инактивация в естественных условиях крайне нежелательна, что делает PHZ привлекательным направлением для разработки средств биоконтроля для сельского хозяйства [28].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Объектом исследования в данной работе служил штамм-продуцент антимикробного соединения фазолицина *Rhizobium* sp. Pop5, любезно предоставленный профессором Мартинез-Ромеро. Также исследовали штаммы бактерий из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН, выделенные из клубеньков фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.): PVu1, PVu2, PVu5, PVu6, PVu7, PVu8, PVu9, PVu10, PVu11, PVu12, St2, St3, St4, St5 и St6.

В качестве контрольных использовали штаммы *Rhizobium leguminosarum*, изолированные из клубеньков растений чины весенней, чины болотной и клевера розового.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Приготовление питательных сред для культивирования клубеньковых бактерий

Таблица 1

Составы использованных стандартных водных растворов

Раствор	Реактивы
среда RM	1% маннитол, 0,01% NaCl, 0,05% K ₂ HPO ₄ , 0,02% MgSO ₄ , 0,1% дрожжевой экстракт
среда YM	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (30%)
агаризованная среда YM (YMA)	маннитол (1%), дрожжевой экстракт (0,04%), NaCl (0,01%), MgSO ₄ (0,01%), K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (0,05%), CaCl ₂ (30%), агар-агар (1.5%)

Продолжение таблицы 1

безазотная питательная среда	KH_2PO_4 (0,02%), K_2HPO_4 (0,08%), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%), FeCl_3 (следы), Na_2MoO_4 (следы), дрожжевой экстракт (0,05%), сахароза (2 %)
среда LB	1% бактопептон, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,01% NaCl)
среда TY	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%), CaCl_2 (0,1%)
агаризованная среда TY	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,1%), CaCl_2 (0,1%), агар-агар (1.5%)

Жидкие среды без агара, твердые с 2% агаром.

Таблица 2

Различные источники углеводов

№	Источник	Производитель
1	Арабиноза L (+)	Диа-М
2	D(+)-Xylose	Fluka
3	D-mannitol	Sigma
4	D(+) лактоза	XPC
5	i-inosit	Serva
6	D-Sorbit	Serva
7	Глюкоза	XPC
8	Сахароза	XPC
9	Патока (темная)	5 л банка
10	D-mannitol+глицерин	Sigma/Serva

Таблица 3

Различные дрожжевые экстракты.

№	Наименование	Производитель
1	Экстракт дрожжевой Аминный азот $\geq 4,0\%$	ДИА-М
2	Дрожжевой экстракт (106, тип Б) Аминный азот $\geq 5,0\%$	
3	Пептон дрожжевой порошок Аминный азот $\geq 3,0\%$	
4	Дрожжевой экстракт (107, тип D) микрогранулы Аминный азот $\geq 4,5\%$	
5	Экстракт дрожжевой ультрафильтрованный Аминный азот $\geq 5,0\%$	
6	Дрожжевой экстракт. Без содержания солей. Тип А.	Helicon
7	Дрожжевой экстракт микрогранулированный	

Сухие компоненты растворяли в дистиллированной воде. Стерилизовали питательную среду в автоклаве при 121°C в течение 30 мин.

2.2.2. Оживление штаммов клубеньковых бактерий после криохранения

Коллекционные штаммы хранятся в морозильной камере -70°C. В качестве криопротектора 30% глицерин. Для оживления коллекционные штаммы помещали в замороженный штатив. Затем простерилизованной в пламени горелки бактериологической петлей отбирали небольшое количество замороженных клеток и наносили на твердую питательную среду УМ. Работу проводили в ламинарном боксе. Чашки Петри помещали в термостат на 28°C и инкубировали в течение 1-2 суток.

2.2.3. Получение бактериального газона

Для получения равномерного бактериального газона штамм-подложку наращивали в колбах в течение 2 суток. Далее 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.

2.2.4. Проведение скрининга штаммов ризобий фасоли на синтез антимикробных соединений

Наращивали бактериальную суспензию исследуемых штаммов в 15 мл пробирках типа Falcon в 4 мл питательной среды YM. Пробирки инкубировали в термостатируемом шейкере ES-20 (BioSan, Латвия) при 28°C в течение 2 суток, аналогично инкубировали и штаммы для бактериального газона ГЛ9 и PVu2. Для получения контрольного газона использовали ночную культуру рекомбинантного штамма *E.coli*ΔTolC, выращенную в питательной среде LB с добавлением ампициллина (50 мкг/мл). При необходимости получения большего объема бактериальной суспензии штаммы для подложки выращивали в стеклянных колбах объемом 100 мл. Для анализа продукции бактериями антимикробных соединений в процессе их роста в среду отбирали по 500 мкл суспензии и переносили в стерильные пробирки эппендорф. Затем осаждали бактерии при 8000 об/мин в течение 5 мин в центрифуге MiniSpinPlus (Eppendorf, Германия). Далее на бактериальный газон наносили по 0,5 мкл непосредственно суспензии клеток и по 5 мкл надосадочной жидкости. Чашки помещали в термостат (28°C, ризобиальный газон; 37°C, *E. coli*) на

сутки. По окончании инкубации проводили визуальную оценку зон ингибирования и детекцию зон подавления контрольного штамма *E.coli*ΔTolC с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

2.2.5. Обработка бактерий флавоноидами

Для опытов с активацией синтеза антибактериальных соединений в пробирку типа Falcon (15 мл) со средой 4 мл добавляли 4 мкл флавоноидов (конечная концентрация составляла 100нМ). Затем бактериологической петлей вносили ризобии. Инкубировали при 28°C в течение 2-ое суток при активном перемешивании (190 об/мин) в термостатируемом шейкере ES-20 (BioSan, Латвия). Далее осуществляли раскапывание на штамм-подложку согласно схеме исследования.

В качестве флавоноидов для исследования были взяты апигенин и таксифолин.



apigenin

Рисунок 2. Структура апигенина

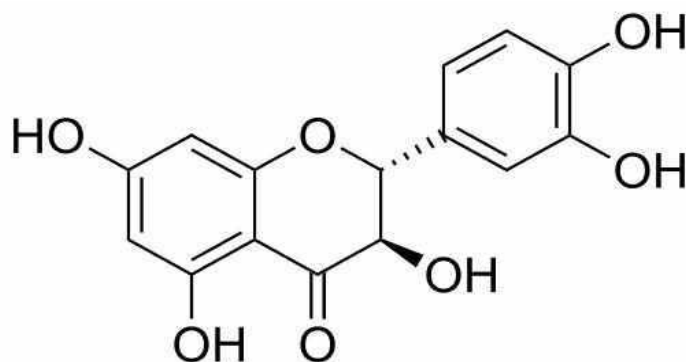


Рисунок 3. Структура таксифолина

2.2.6. Постановка опыта с инокуляцией корней проростков фасоли ризобиями

Наращивали культуры в жидкой среде YM до 1×10^8 КОЕ/мл. Далее в промытый под проточной водой песок вносили культуры бактерий в соотношении:

- а) 1:1 – Pop5+PVu6;
- б) 1:1:1 – Pop5+PVu6+St4;
- в) 1:1:1:1 – Pop5+PVu6+St4+St5.

Песок так же обрабатывали культурой *Rhizobium* sp. Pop5. Семена фасоли обыкновенной промывали под проточной водой, затем стерилизовали в 70% спирте в течение 5 минут. Далее семена сажали в песок. Через 21 день корни проросших растений откапывали из песка и промывали в проточной воде. Подсчитывали количество сформировавшихся клубеньков.

После отделили клубеньки ножницами и помесили в фальконы. Далее промывали сначала под проточной водой, затем в дистиллированной воде с мылом, плавно перемешивая. Повторяли несколько раз, после добавили хлорамин и сливали под ламинарным боксом. Далее промывали несколько раз в стерильной воде потом в спирте и снова в стерильной воде.

2.2.7. Выделение бактерий из клубеньков

Клубеньковые бактерии изолировали методом получения пункций ткани клубенька из зоны размножения микроорганизмов с последующим рассевом до отдельных колоний на питательной среде УМ. В исследование брали по одному изоляту, полученному из каждого клубенька.

2.2.8. Выделение ДНК из бактерий

В ходе проведения исследования был использован метод лизирования клеток для выделения ДНК. Для этого небольшое количество бактериальной массы помещали в 1,5 мл пробирки со смесью 1% TritonX100 и 1% суспензии Chelex100, затем производили инкубирование при температуре 95°C в течение 10 минут с последующим центрифугированием при 13 тыс об/мин в течение 5 минут для отделения клеточного дебриса от матрицы для ПЦР - надосадочной жидкости. Полученная матрица была использована для дальнейшего анализа ДНК.

2.2.9. RAPD-анализ

RAPD-анализ (случайное праймирование) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - полимеразная цепная реакция, основанная на использовании одного, обычно декануклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью

Методика RAPD включает:

1. Экстракцию высокочистой тотальной ДНК, при этом требования к качеству ДНК более высокие, чем при обычной ПЦР. Для растений чаще всего используют методы выделения ДНК при помощи ЦТАБ (цетил-триметиламмоний бромид) из высушенного материала
2. Расчет компонентов на один образец. Концентрация праймера 10 мкМ
-Дистиллированная вода 13 мкл
-буфер 2,5 мкл

- dNTP 2,5 мкл
- праймер 1 мкл
- Tag-полимераза 1 мкл
- ДНК 4 мкл

Готовую смесь раскапываем по пробиркам и после добавляется 4 мкл ДНК

3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).
4. Разделение ПЦР-фрагментов гель- электрофорезом. Чаще всего используют 1,5- 1,7% агарозный гель.
5. Визуализацию RAPD-спектра после окрашивания этидиум бромидом под ультрафиолетовым светом трансиллюминатора.
6. Определение размеров RAPD-фрагментов по сравнению с известным молекулярным маркером с помощью программного обеспечения для анализа геля.

Маркеры данного метода представляет собой продукты амплификации случайных последовательностей ДНК ограниченных произвольными олигонуклеотидными праймерами.

В исследовании использовался праймер AFK-1: 5'-acggtggacg-3' для проведения RAPD-анализа. С целью избежания испарения жидкости на поверхности каждой реакционной смеси, было добавлено 20 мкл минерального масла. ПЦР проводилась на амплификаторах MC2 «Терцик» компании "ДНК-технология" (Россия). Первоначально производилась денатурация ДНК при 95°C, за которой следовало 30 циклов амплификации. Каждый цикл включал в себя стадию денатурации ДНК в течение 30 секунд при 95°C, отжиг праймеров продолжительностью 40 секунд при температуре от 33°C до 53°C и стадию элонгации в течение 1 минуты 20 секунд при температуре 72°C, которая была оптимальна для активности Taq ДНК-полимеразы. На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 минут для

завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью достроенные молекулы.

2.2.10. Электрофорез в агарозном геле

В данном исследовании был проведен процесс электрофоретического фракционирования препаратов ДНК в геле на основе агарозы с содержанием 1,5– 2,0%. В качестве источников питания использовались приборы модели 250/2.5 фирмы Bio Rad (США) или модели «Эльф – 4» фирмы ДНК-технология (Россия). Толщина применяемых гелей незначительно отличалась в разных экспериментах, составляя от 2 до 4 мм. Для формирования колодцев использовались гребенки толщиной 1,5 мм с зубчиками шириной от 3 до 8 мм. В качестве буферной системы выбирали ТАЕ – буфер. Для проведения электрофореза использовался 100 бр ДНК маркер 100-1500 п.н. (Евроген, Россия). После окончания электрофореза ДНК в гелях окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 минут. Регистрацию флуоресценции нуклеиновых кислот проводили при помощи специальной фотодокументационной системы фирмы UVP (США) в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм. Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для более детального изучения процесса электрофоретического фракционирования препаратов ДНК и разработки методов его оптимизации.

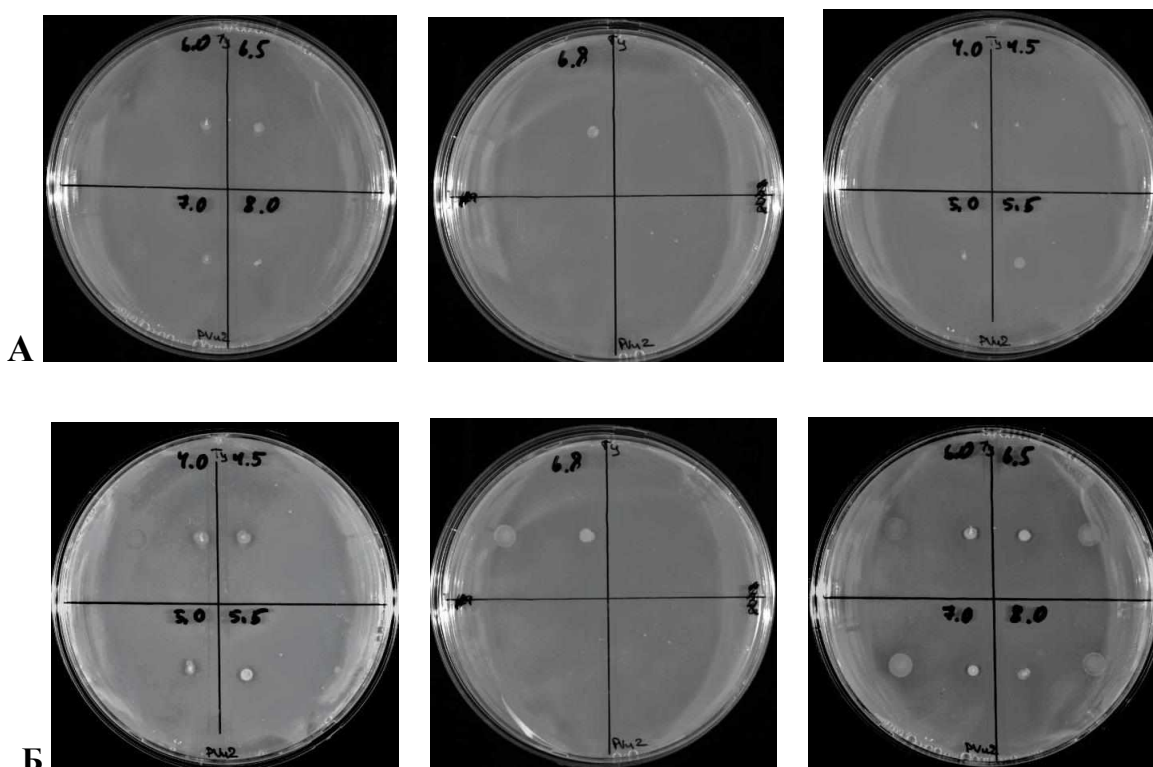
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Определение оптимальных условий синтеза антибактериальных соединений штаммом *Rhizobium* sp. Pop5

Выработка фазолицина у штамма *Rhizobium* sp. Pop5 наблюдалась нами при выращивании на следующих питательных средах: YM, RM, C40, TY. Лучшие результаты (по величине пятна подавления) наблюдали при использовании среды RM.

3.1.1. Влияние различных pH на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений

Исследуемый штамм - *Rhizobium* sp. Pop5, как штамм подложка была использована P.Vu2, среда была использована TY. Результат оценивали через 24 ч, 48 ч, 72 ч. Диапазон pH 4,0-8,0



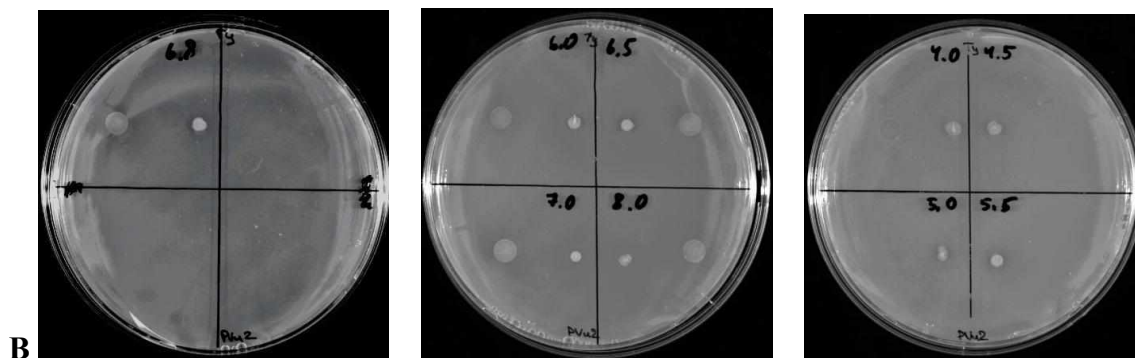


Рисунок 5. Влияние различных pH на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений в течение А-24 часов, Б-48 часов, В-72 часов

Пришли к выводу, что при pH 6,8 и роста бактерий в течение 2 суток дает лучший результат. Поэтому в дальнейшем уже использовали такие параметры для выращивания штамма *Rhizobium* sp. Pop5.

3.1.2. Влияние различного дрожжевого экстракта на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений

Среда RM, дрожжевой экстракт по 1 гр на 1 л среды, pH 6,8 Явных отличий не было выявлено, ореол был примерно 1 мм, а где-то едва заметный. Тем не менее, при использовании - Пептон дрожжевой порошок Аминный азот $\geq 3,0\%$, ореол был четче.

3.1.3. Влияние различных источников углеводов на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений

Среда RM, источник С по 10 гр на 1 л среды, pH 6,8, за исключением №10 (D-mannitol + глицерин, 3 г и 4 мл на 1 л среды, соответственно)



Рисунок 6. 1 – арабиноза, 2 – ксилоза, 3 – маннитол, 4 – лактоза, 5 – инозитол, 6 – сорбитол, 7 – глюкоза. 8 – сахароза, 9 – патока, 10 – маннитол+глицерин

Таблица 3

Различные источники углеводов и их влияние на штамм Pop5

№	Источник углеводов	Производитель	Рост 24 ч	Рост 48 ч
1	Арабиноза L (+)	Диа-М	+	+
2	D(+)-Xylose	Fluka	-	-
3	D-mannitol	Sigma	+	+
4	D(+) лактоза	XPC	+	+
5	i-inosit	Serva	+	+
6	D-Sorbit	Serva	+	+
7	Глюкоза	XPC	+	+
8	Сахароза	XPC	+	+
9	Патока (темная)	5 л банка	+	+
10	D-mannitol+глицерин	Sigma/Serva	+	+

Никакого различия во влиянии различных источников углеводов на продукцию антимикробных соединений штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 не было отмечено.

3.1.4. Влияние наличия других бактерий и их лизатов на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений

Исследуемый штамм - *Rhizobium* sp. Pop5; Штамм подложка P.Vu2; Штамм подложка *E.coli*ΔTolC

Среда RM, pH среды 6,8

Штаммы других бактерий, которые использовали как в живом виде, так и в лизированном: 1) ГЛ9 (*Rhizobium leguminosarum*) 2) PVu2 (*Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli) 3) *E. coli* 4) *Pseudomonas* sp.

Суспензию **живых** бактерий добавляли к суточной культуре *Rhizobium* sp. Pop5 и наращивали еще сутки. Лизат добавляли сразу совместно с инокуляцией штамма Pop5 и наращивали в течение 2 суток

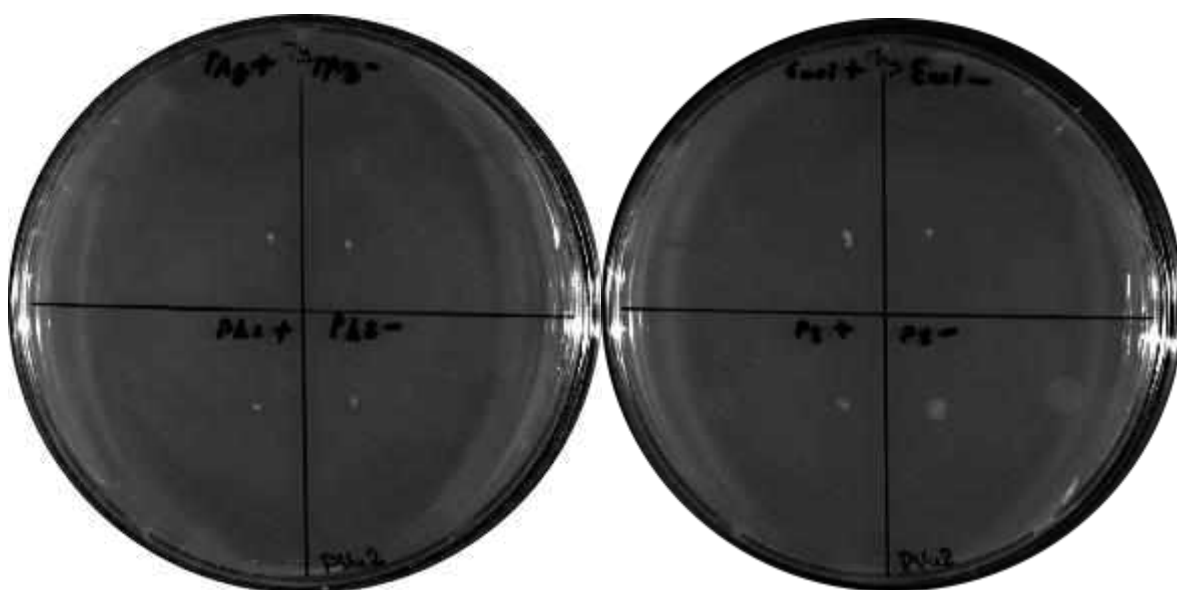


Рисунок 7. Влияние других бактерий и их лизатов на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5.

Влияние других бактерий и их лизатов на продукцию штаммом Pop5

Штамм	Живые	Лизаты
ГЛ9	Точка есть, ореол примерно 1 мм Капля размыта	Точка есть, ореол примерно 0,5 мм Капля размыта
<i>PVu9</i>	Точка есть, ореол примерно 0,5 мм Капля размыта	Точка +- Капля размыта
<i>E.coli</i>	Точка есть, ореол примерно 1,5 мм Капля размыта	Точка есть, ореол примерно 1,5 мм Капля размыта
<i>Pseudomonas</i>	Точка есть, ореол примерно 1 мм Капля заросла	

Особого влияния не было отмечено, наличие других бактерий не влияет на синтез *Rhizobium* sp. Pop5. Из полученных результатов можно утверждать, при нанесении живых бактерий, подавление становится незначительно выше. Вероятно, это связано с тем, что иногда синтез антибактериальных соединений активируется в присутствии некоторых бактерий.

3.1.5. Влияние флавоноидов на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений

Флавоноиды представляют собой категорию натуральных фитохимикатов, содержащихся практически в абсолютно всех тканях растений, где они осуществляют разнообразные функции. Апигенин — один из наиболее распространенных агликонов флавонов, природный антиоксидант обладающий противовоспалительными и антиканцерогенными свойствами. Таксифолин также известный как дигидрокверцетин, относится к подклассу флаванолов в группе флавоноидов, которые, в свою очередь, являются классом полифенолов.

Было решено проверить активность *Rhizobium* sp. Pop5 при добавления флавоноидов: апигенин, генистеин, таксифолин, кверцетин, гесперидин, нарингенин, проантоцианиды. Как штамм подложку взяли PVu2 и ГЛ9.

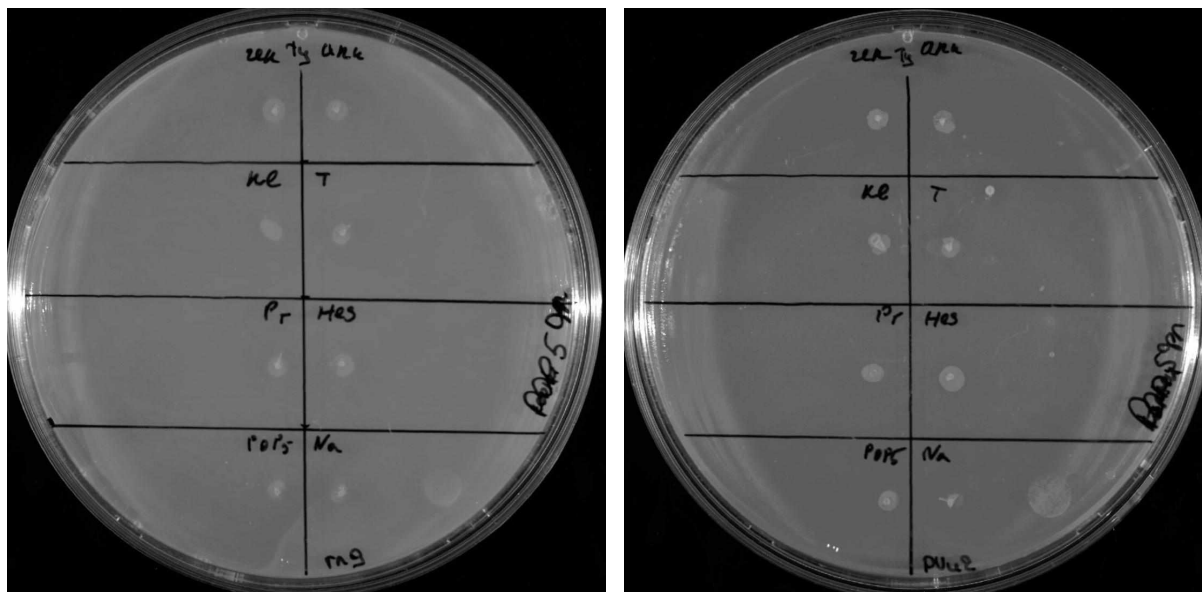
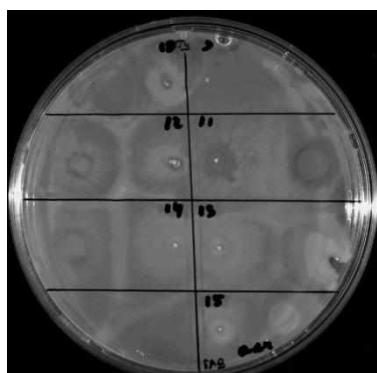


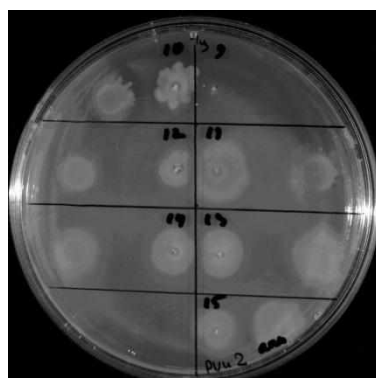
Рисунок 8. Влияние флавоноидов на продукцию антимикробных соединений штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 с подложкой PVu2 и ГЛ9.

Активации флавоноидами влияние на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 не произошла. Для сравнения добавляли флавоноиды апегенин и таксифолин в бактерии выделенных из клубеньков 9 – чина весенняя 14; 10 – чина весенняя 8; 11 – чина болотная 5; 12 – клевер розовый 3.2а; 13 – клевер розовый 3.2; 14 – клевер розовый 3.3; 15 – клевер розовый 5.10. Для этого в жидкую среду RM объемом 4 мл были посажены бактерии и после добавляли по 4 мкМ флавоноиды с концентрацией 100 нМ

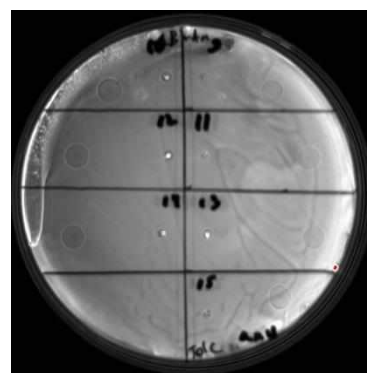
Апигенин



ГЛ9

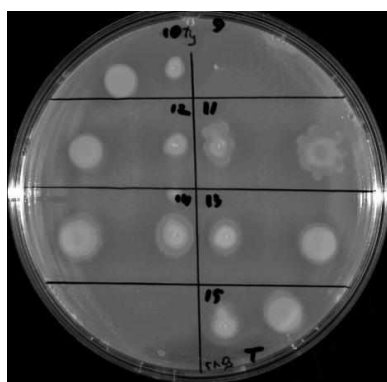


PVu2

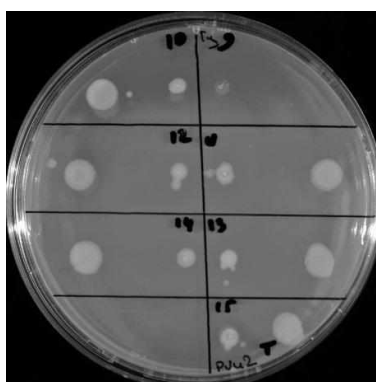


*E.coli*ΔTolC

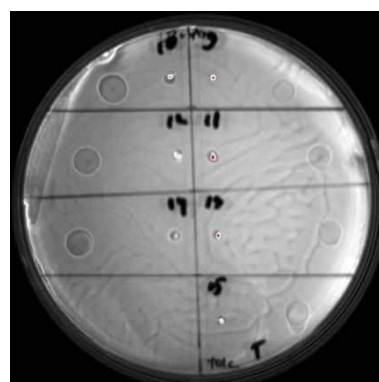
Таксифолин



ГЛ9



PVu2



*E.coli*ΔTolC

Рисунок 9. Влияние флавоноидов на продукцию антимикробных соединений штаммом *Rhizobium* sp. Pop5

Были использованы следующие штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii*: 9 – чина весенняя 14; 10 – чина весенняя 8; 11 – чина болотная 5; 12 – клевер розовый 3.2а; 13 – клевер розовый 3.2; 14 – клевер розовый 3.3; 15 – клевер розовый 5.10.

Концентрация флаваноидов 100 нМ.

При активации флаваноидами влияние на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 не произошла, что касательно фасолевых, у них тоже активации не наблюдалось, в то время наблюдалось что *R. leguminosarum* вступающий в симбиоз с бактериями выделенных из клубеньков Чина весенняя, Чина весенняя, Чина болотная, Клевер розовый, Клевер розовый, Клевер розовый, Клевер розовый усиливает синтез антибактериальных

веществ и зону подавления ризобияльного газона при добавлении апегенина и таксифолина.

3.2. Скрининг штаммов ризобий фасоли из коллекции «Симбионт» на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий

Таблица 5.

Подавление роста клеток газона бактерий метаболитами и живыми культурами ризобий.

Растение-хозяин (количество штаммов ризобий, взятых в анализ)	Штамм бактерий газона					
	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VSyl9		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> PVu2		<i>E. coli</i> W5503(Δ tolC)	
	○	●	○	●	○	●
Фасоль обыкновенная (10)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)	2 (20%)	10 (100%)

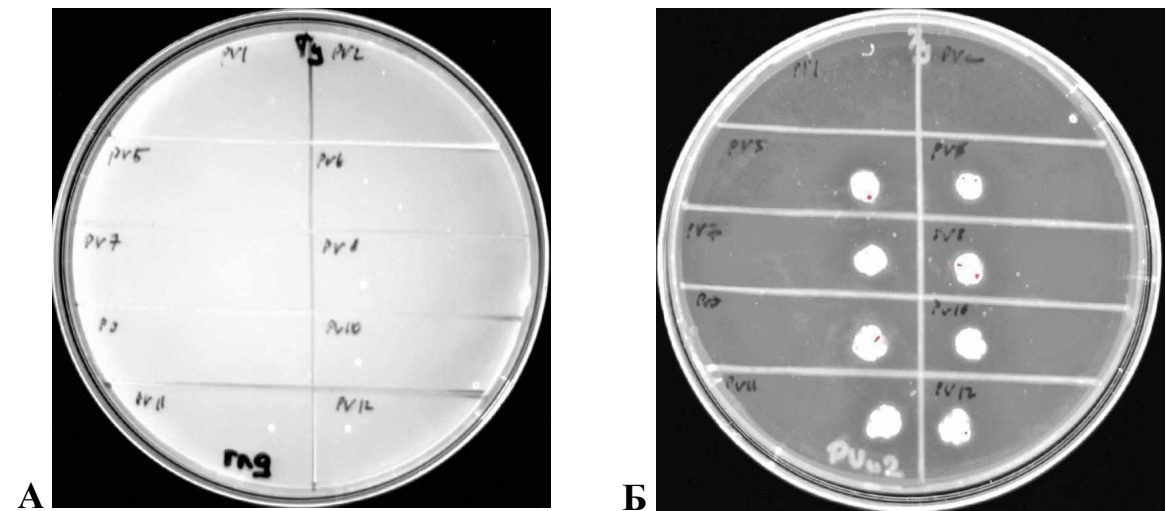


Рисунок 10. 10 исследованных штаммов, выделенных из клубеньков фасоли обыкновенной на подложке А-PVu2 и Б-ГЛ9.

Десять исследованных штаммов, выделенных из клубеньков фасоли обыкновенной, не обладали антимикробной активностью как против *Rhizobium phaseoli* (PVu2) своего рода, так и родственного штамма *Rhizobium leguminosarum* (ГЛ9). Это может быть из-за того, что конкуренции между этими штаммами нет.

3.3. Оценка способности мексиканского штамма *Rhizobium* sp. Pop5 формировать клубеньки при конкурентном заражении семян фасоли обыкновенной с местными штаммами ризобий.

Для этого из коллекции были отобраны штаммы, которые имели хорошую клубенекообразующую активность т.е формировали клубеньки: PVu6, St4, St5. Далее из этих штаммов выделяли ДНК. Проводили RAPD-анализ. И после электрофоретического разделения молекул ДНК получали RAPD профиль, с характерным набором полос для каждого штамма. Это делали для того, чтобы потом после обработки посмотреть какой штамм заразил. Мелкоделяночный опыт. Наращивали культуры в жидкой среде Ym до 1×10^8 . Промывали песок. В песок вносили культуру бактерий в соотношении: 1:1 – Pop5+PVu6; 1:1:1 – Pop5+PVu6+St4; 1:1:1:1 – Pop5+PVu6+St4+St5, так же обрабатывали песок и культурой *Rhizobium* sp. Pop5. Семена промывали под проточной водой, затем стерилизовали в 70% спирте в течение 5 минут. Далее семена сажали в песок. + почва. Через 21 день вскрывали. И выделили клубеньки.



Рисунок 11. Корень фасоли с клубеньками.

В исследование брали по одному изоляту, полученному из каждого клубенька. Проводили RAPD анализ.

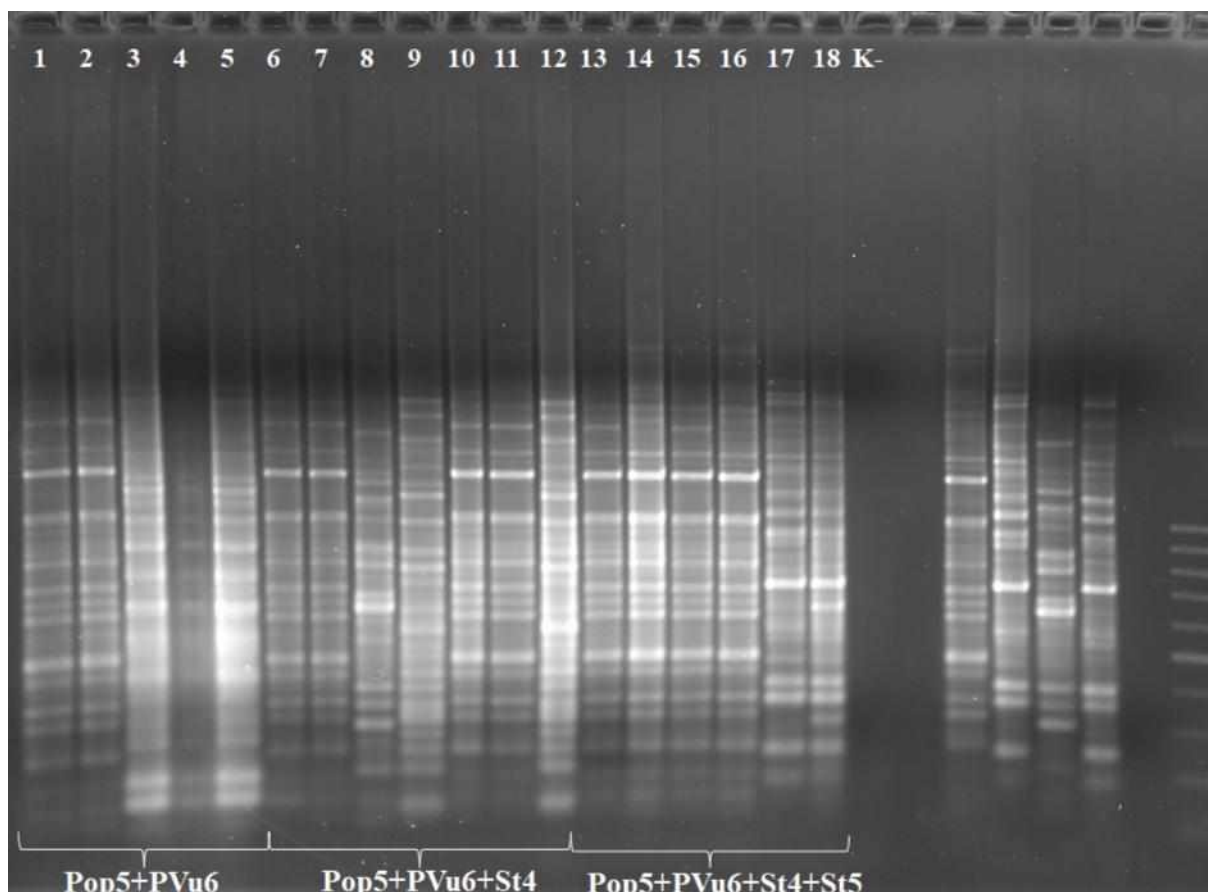


Рисунок 12. RAPD-профиль бактерий, выделенных из клубеньков фасоли.

Как показывает RAPD-анализ во всех клубеньках есть штамм *Rhizobium* sp. Pop5, штаммы имеют разную клубенкообразующую активность, но при этом данные по процентным соотношениям

показывают, что Pop5 составляет 55,6%, PVu6 33,3%, St4 11,1%, St5 0%, это свидетельствует Pop5 может конкурировать с местными штаммами, но не полностью подавлять их активность. Ризобии обширная, генетически разнородная группа почвенных грамотрицательных микроорганизмов, способных вступать во внутриклеточный симбиоз с бобовыми растениями и обеспечивать фиксацию атмосферного азота, *Rhizobium* sp. Pop5 не вытесняет эти бактерии, а вступает с ними симбиоз для дальнейшей фиксации азота, это доказывает образование фазолицина

Ход исследования показал, что *Rhizobium* sp. Pop5. не подавляет рост клубеньковых бактерий местных штаммов. Вероятно, это связано с тем, что ризобии не приспособлены к почвенно-климатическим условиям Южного Урала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клубеньковые бактерии (ризобии), вступающие в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми, конкурируют за образование клубеньков у растений-хозяев, используя различные механизмы, включая продукцию антимикробных соединений. Одним из таких соединений является бактериоцин – фазолицин, который синтезируется штаммом *Rhizobium* sp. Pop5.

Нами показано, что мексиканский штамм *Rhizobium* sp. Pop5. хорошо растет на среде RM при pH = 6.8 в течение двух суток и спонтанно синтезирует вещества, подавляющие рост родственных штаммов ризобий. Подбор дрожжевого экстракта показал, что при использовании в составе питательной среды дрожжевого экстракта, содержащего аминный азот $\geq 3,0\%$ - ореол подавления роста был четче. Нами выявлено, что никакого влияния различных источников углеводов на продукцию антимикробных соединений штаммом Pop5 не отмечается. При исследовании влияния наличия других бактерий и их лизатов на продукцию штаммом *Rhizobium* sp. Pop5 антимикробных соединений, результаты показали, что видимых различий также нет. В отличие от ризобий *Rhizobium leguminosarum*, усиления синтеза антибактериальных соединений при обработке растительными флавоноидами не наблюдается.

Следующим этапом анализа был скрининг штаммов ризобий фасоли из коллекции «Симбионт» на синтез соединений, подавляющих рост типовых и родственных штаммов ризобий. В ходе исследований были получены следующие данные: 10 исследованных штаммов, выделенных из клубеньков фасоли обыкновенной, не обладали антимикробной активностью как против *Rhizobium phaseoli* (PVu2) своего рода, так и родственного штамма *Rhizobium leguminosarum* (ГЛ9).

Заключительным этапом анализа являлась оценка способности мексиканского штамма *Rhizobium* sp. Pop5 формировать клубеньки при

конкурентном заражении семян фасоли обыкновенной с местными штаммами ризобий. Исследование показало, что в конкурентной борьбе ризобии продуцируют свой бактериоцин. Но при оценке подавление роста клубеньковых бактерий между местными штаммами бактерий фасоли и мексиканским штаммом *Rhizobium* sp. Pop5. данные результата показывает, что *Rhizobium* sp. Pop5. не подавляет рост местных клубеньковых бактерий, но активно конкурирует с ними за образование клубеньков, о чем свидетельствует процентный расчет RAPD-анализа, Pop5 составляет 55,6%, PVu6 33,3%, St4 11,1%, St5 0%.

Фазолицин, продуцируемый *Rhizobium* sp. Pop5, представляет интерес не только как регулятор численности ризобий, но и как перспективная антибактериальная молекула для создания новых антибиотиков.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что штамм *Rhizobium* sp. Pop5 спонтанно синтезирует антибактериальные соединения при культивировании на богатых питательных средах. При этом параметры подавления роста родственных бактерий не зависят от pH, компонентов среды и присутствия в культуре живых клеток / лизатов *Rhizobium leguminosarum* и *E. coli*. В отличие от *Rhizobium leguminosarum*, у штамма *Rhizobium* sp. Pop5 синтез антибиотиков при воздействии растительных флавоноидов также не усиливается.

2. Скрининг 10 штаммов ризобий из коллекции «Симбионт», изолированных из клубеньков фасоли обыкновенной, не выявил у них антимикробной активности как против своего вида *Rhizobium phaseoli* (PVu2), так и родственного штамма *Rhizobium leguminosarum* (ГЛ9). Отсутствие активности, видимо, связано с редкой встречаемостью в почвах Южного Урала и, как следствие, отсутствием конкуренции между штаммами *Rhizobium phaseoli*.

3. Опыты с соинокулированием корней проростков фасоли совместно с местными дикими штаммами, показало конкурентное преимущество штамма *Rhizobium* sp. Pop5 при формировании клубеньков, несмотря на то, что местные штаммы лучше приспособлены к почвенно-климатическим условиям Южного Урала.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МЛУ (множественной лекарственной устойчивостью)

ШЛУ (широкой лекарственной устойчивостью)

ЖКТ желудочно-кишечный тракт

SLiPT SbmA-подобный пептидный транспортер

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баймиев А.Х. Клубеньковые бактерии дикорастущих бобовых растений Южного Урала и молекулярное конструирование их искусственных ассоциаций с небобовыми растениями. <https://www.dissercat.com/content/klubenkovye-bakterii-dikorastushchikh-bobovykh-rastenii-yuzhnogo-urala-i-molekulyarnoe-konstr>(дата обращения: 01.05.2023)
2. Бершова О.И. Влияние микроэлементов на микроорганизмы ризосферы сельскохозяйственных растений : автореферат дис. ... доктора биологических наук / Бершова О.И.; [Место защиты: Объединенный ученый совет биологических наук]. - Киев, 2019. - 36 с.
3. Борисов А.Ю., Жуков В.А., Тихонович И.А., Рычагова Т.С., Штарк О.Ю. Генетический контроль специфичности взаимодействия бобовых растений с клубеньковыми бактериями // Экол. генет. 2018. - Т. 7, - № 4. - С. 12-19
4. Васильченко А.С. Биологическая активность антимикробных пептидов *Enterococcus faecium*. <https://cyberleninka.ru/article/n/biologicheskaya-aktivnost-antimikrobnnyh-peptidov-enterococcus-faecium> (дата обращения: 02.05.2023)
5. Долматова Е.С. Клубеньковые азотфиксирующие бактерии // Материалы VII Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум» URL: <https://scienceforum.ru/2015/article/2015013279>><https://scienceforum.ru/2015/article/2015013279> .
6. Долгих Е. А., Долгих А.В., Кириенко А.Н., Лепянен И.В. Роль фитогормонов в контроле развития симбиотических клубеньков у бобовых растений. Сообщение I. Цитокинины //Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – №. 3. – С. 285-298.

7. Каримова Е. Р., Худайгулов Г. Г. Изучение влияния биопрепарата на основе клубеньковых бактерий *Rhizobium lupini* на бобовые и злаковые культуры //Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. – 2018. – Т. 6. – №. 2. – С. 52-57.

8. Картыжова Л. Е., Кондрацкая И. П. Физиолого-биохимические свойства и особенности функционирования клубеньковых бактерий *rhizobium galegae* в экстремальных условиях //The Scientific Heritage. – 2022. – №. 96. – С. 13-26.

9. Онищук О.П., Симаров Б.В. Генетическая изменчивость нодуляционной конкурентоспособности у клубеньковых бактерий и ее использование в селекции. // Генетика. 2019. - Т. 31, - № 3, - С. 293 - 303

10. Феоктистова Н.В. Ризосферные бактерии. <https://cyberleninka.ru/article/n/rizosfernye-bakterii> (дата обращения: 23.04.2023)

11. Якоменко М.В. Изменение свойств клубеньковых бактерий сои родов *Bradyrhizobium* и *Sinorhizobium* амурской селекции под воздействием экологических факторов. <https://www.dissercat.com/content/izmenenie-svoistv-klubenkovykh-bakterii-soi-rodov-bradyrhizobium-i-sinorhizobium-amurskoi-se> (дата обращения: 26.04.2023)

12. Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Al Karaawi MA, Siddiqui MU. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int J Antimicrob Agents*. 2017; 49(1): 1- 11.

13. Bonhi KLR, Imran S. Role of bacteriocin in tackling the global problem of multi-drug resistance: an updated review. *Biosci Biotechnol Res Comm*. 2019; 12(3): 601- 608.

14. Diaz-Ruiz G, Omar NB, Abriouel H, Cantilde MM, Galvez A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* EC52 in a meat sausage model system. *Afr J Microbiol Res*. 2012; 6(6): 1103- 1108.

15. Duval R.E., Grare M., Demoré B. Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria. *Molecules*. 2019;24:3152. doi: 10.3390/molecules24173152.
16. Fernández L, Delgado S, Herrero H, Maldonado A, Rodriguez JM. The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J Hum Lact*. 2008; 24(3): 311- 316
17. Gratia A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coillbacille. *CR Sessions Soc*. 1925;93:1040-1041.
18. Jabés D, Brunati C, Candiani G, Riva S, Romanó G, Donadio S. Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(4): 1671- 1676.
19. Liu G, Ren L, Song Z, Wang C, Sun B. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium* animals BB04 from centenarians' intestine. *Food Control*. 2015; 50: 889- 895.
20. Morales-Estrada AI, Lopez-Merino A, Gutierrez-Mendez N, Ruiz EA, Contreras-Rodriguez A. Partial characterization of bacteriocin produced by halotolerant *Pediococcus acidilactici* strain QC38 isolated from traditional Cotija Cheese. *Polish J Microbiol*. 2016; 65(3): 279- 285.
21. Morency H, Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC. Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or a lantibiotic. *Can J Microbiol*. 2001; 47(4): 322- 331.
22. Morisset D, Frère J. Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie*. 2002; 84(5–6): 569- 576.
23. Olasupo N. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by plantaricin NA, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum*. *Folia Microbiol*. 1998; 43(2): 151- 155.

24. O'Sullivan JN, Rea MC, O'Connor PM, Hill C, Ross RP. Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. *FEMS Microbiol Ecol.* 2019; 95(2):fy241.
25. Perales-Adán J, Rubiño S, Martínez-Bueno M, et al. LAB bacteriocins controlling the food isolated (drug-resistant) staphylococci. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1143.
26. Ramakrishnan V, Narayan B, Halami PM. Combined effect of enterocin and lipase from *Enterococcus faecium* NCIM5363 against food borne pathogens: mode of action studies. *Curr Microbiol.* 2012; 65(2): 162- 169.
27. Sahoo TK, Jena PK, Patel AK, Seshadri S. Purification and molecular characterization of the novel highly potent bacteriocin TSU4 produced by *Lactobacillus animalis* TSU4. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015; 177(1): 90- 104.
28. Sivarooban T, Hettiarachchy N, Johnson M. Transmission electron microscopy study of *Listeria monocytogenes* treated with nisin in combination with either grape seed or green tea extract. *J Food Prot.* 2008; 71(10): 2105- 2109.
29. Tiwari SK, Srivastava S. Characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14. *Food Biotechnol.* 2008; 22(3): 247- 261.
30. Todorov SD. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Braz J Microbiol.* 2009; 40(2): 209- 221.
31. Todorov S, Dicks L. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme Microb Technol.* 2005; 36(2–3): 318- 326.
32. Von Mollendorff J, Todorov S, Dicks L. Comparison of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from the Balkan Peninsula. *Curr Microbiol.* 2006; 53(3): 209- 216.

Отчет о проверке на заимствования №1



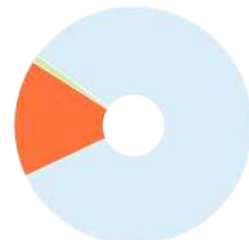
Автор: Хасанова Надия Сагитовна
Проверяющий: Кобзева Наталья Рудольфовна
Организация: Башкирский государственный медицинский университет
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://bashgmu.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 11650
Начало загрузки: 23.06.2023 09:50:44
Длительность загрузки: 00:00:09
Имя исходного файла: Хасанова Надия Сагитовна ВКР.doc
Название документа: Штамм RhizobiumSP.Pop5, продуцирующий пептидный бактериоцин - фазолицин
Размер текста: 70 кБ
Тип документа: Выпускная квалификационная работа
Символов в тексте: 71899
Слов в тексте: 8285
Число предложений: 567

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 23.06.2023 09:50:53
Длительность проверки: 00:01:18
Корректировка от 23.06.2023 10:02:53
Комментарии: [Автосохраненная версия]
Поиск с учетом редактирования: да
Проверенные разделы: титульный лист с. 1, содержание с. 2-3, основная часть с. 4-47, библиография с. 48-51
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
16,2%	0%	1,09%	82,71%

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.

Самоцитирования — 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.

Цитирования — 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]	9,57%	0%	не указано	29 Сен 2022	Библиография	0	1	
[02]	9,04%	3,7%	Баймиев, Андрей Ханифович диссерт... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	4	11	
[03]	7,75%	0%	Диссертация на тему «Клубеньковые ... https://dissercat.com	13 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	12	
[04]	7,46%	0%	Диссертация на тему «Клубеньковые ... http://dissercat.com	27 Мар 2019	Интернет Плюс*	0	25	
[05]	6,65%	0,44%	Клубеньковые бактерии дикорастущ... http://earthpapers.net	23 Окт 2017	Интернет Плюс*	7	29	
[06]	6,53%	0%	Клубеньковые бактерии дикорастущ... http://netess.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	28	
[07]	6,5%	0%	«КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ ДИКОРА... http://ibg.anrb.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	6	
[08]	6,38%	0%	Клубеньковые бактерии дикорастущ... http://netess.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	25	
[09]	6,38%	1,68%	Баймиев, Андрей Ханифович Клубень... http://dlib.rsl.ru	01 Фев 2013	Сводная коллекция РГБ	2	8	
[10]	6,22%	0%	КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ ДИКORAC... http://geum.ru	14 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	31	
[11]	5,26%	0%	Bacteriocins: Properties and potential u...	18 Янв 2022	Издательство Wiley	0	18	

[12]	5,2%	1,83%	Клубеньковые бактерии дикорастущ... http://earthpapers.net	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	4	
[13]	5,2%	0%	DiBase.ru :: Клубеньковые бактерии д... http://dibase.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	4	
[14]	4,25%	0%	Bacteriocins: Properties and potential u...	18 Янв 2022	Перефразирования по коллекции издательства Wiley	0	15	
[15]	3,39%	1,31%	Гуменко, Роман Сергеевич Получени... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	3	6	
[16]	3,12%	0,16%	https://esu.citis.ru/ikrbs/OYOLYREGT92... https://esu.citis.ru	20 Мар 2018	Интернет Плюс*	2	35	
[17]	3,05%	0%	БИОИНЖЕНЕРИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	5	
[18]	2,93%	0,11%	Нигматуллина, Лилия Ралисовна Бакт... http://dlib.rsl.ru	11 Июн 2020	Сводная коллекция РГБ	2	6	
[19]	2,67%	1,5%	«СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ КАК ИНСТ... http://ibg.anrb.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	4	4	
[20]	2,22%	0%	БИОИНЖЕНЕРИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	6	
[21]	2,14%	0%	ФИЗИОЛОГИЯ ТРАНСГЕННОГО РАСТ... http://elibrary.ru	26 Фев 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	2	
[22]	2,01%	0%	http://csl.isc.irk.ru/BD/BooksJRO/%D0%... http://csl.isc.irk.ru	21 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	24	
[23]	1,89%	0%	ФИЗИОЛОГИЯ ТРАНСГЕННОГО РАСТ... http://elibrary.ru	26 Фев 2015	eLIBRARY.RU	0	5	
[24]	1,83%	0,16%	https://www.rusoil.net/files/%D0%9D%... https://rusoil.net	14 Мая 2019	Интернет Плюс*	3	8	
[25]	1,59%	0%	Создание новых ассоциативных симб... http://elibrary.ru	17 Янв 2013	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	
[26]	1,57%	0%	https://rusoil.net/files/%D0%9D%D0%9... https://rusoil.net	07 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	4	
[27]	1,45%	1,45%	МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ, ПРИМЕН... http://elibrary.ru	14 Янв 2020	Перефразирования по eLIBRARY.RU	2	2	
[28]	1,45%	0,01%	Лектины бобовых растений как инст... http://earthpapers.net	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	3	
[29]	1,45%	0%	«Лектины бобовых растений как инст... http://ibg.anrb.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	3	
[30]	1,42%	0,05%	МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ, ПРИМЕН... http://elibrary.ru	14 Янв 2020	eLIBRARY.RU	1	2	
[31]	1,4%	0%	Страницы 290-318 выпуска Том 10, №... https://biomicsj.ru	25 Ноя 2020	Интернет Плюс*	0	6	
[32]	1,38%	0%	https://biomicsj.ru/upload/iblock/441/8... https://biomicsj.ru	04 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	6	
[33]	1,38%	0%	https://biomicsj.ru/upload/iblock/441/8... https://biomicsj.ru	19 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	6	
[34]	1,34%	1,34%	Весь номер PDF (3/9) http://kpfu.ru	28 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	1	1	
[35]	1,3%	0%	Клубеньковые бактерии дикорастущ... http://earthpapers.net	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	2	
[36]	1,26%	0%	ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЪЮГАТИВНОЙ ... http://elibrary.ru	31 Янв 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	2	
[37]	1,26%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F105381064... https://kpfu.ru	11 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	
[38]	1,26%	0%	Ризосферные бактерии – тема научн... https://cyberleninka.ru	24 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	1	
[39]	1,24%	0%	ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЪЮГАТИВНОЙ ... http://elibrary.ru	31 Янв 2017	eLIBRARY.RU	0	2	
[40]	1,22%	0%	https://kpfu.ru/portal/docs/F105531907... https://kpfu.ru	31 Дек 2020	Интернет Плюс*	0	2	
[41]	1,21%	0%	Лектины бобовых растений как инст... http://earthpapers.net	10 Мар 2018	Интернет Плюс*	0	12	
[42]	1,14%	0,1%	«МОЛОДОЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬ: ВЫЗО... https://docplayer.ru	28 Окт 2020	Интернет Плюс*	2	8	
[43]	1,13%	1,13%	ГЕНЫ <i>>SDR<i>> РАСПРОСТ... http://elibrary.ru	31 Авг 2017	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[44]	1,09%	1,09%	не указано	29 Сен 2022	Шаблонные фразы	22	22	
[45]	1%	0%	https://genomics.uz/f/sbornik_konfere... https://genomics.uz	09 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	3	
[46]	0,82%	0%	Bacteriocins, Antimicrobial Peptides fro... https://ncbi.nlm.nih.gov	12 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,78%	0%	Isolation and identification of bacterioci... https://doi.org	30 Июн 2013	Издательство Wiley	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,75%	0,75%	В почве тропического леса нашли но... https://indicator.ru	10 Авг 2019	СМИ России и СНГ	1	1	
[49]	0,72%	0%	http://www.ibpm.ru/attachments/articl... http://ibpm.ru	17 Дек 2016	Интернет Плюс*	0	7	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,7%	0%	Диссертация: "Миграция изотопов ... https://yaravtomch.ru	17 Июн 2021	Интернет Плюс*	0	3	
[51]	0,62%	0%	http://scholar.sun.ac.za/bitstream/han... http://scholar.sun.ac.za	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[52]	0,55%	0%	Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Me... https://frontiersin.org	20 Авг 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,5%	0,5%	БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИ... http://elibrary.ru	16 Фев 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[54]	0,49%	0%	Рябинин, Георгий Владимирович Био... http://dlib.rsl.ru	05 Апр 2022	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,48%	0%	Insights in the Antimicrobial Potential o... https://frontiersin.org	20 Окт 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,47%	0%	Identification and Partial Characterizati... https://doi.org	31 Янв 2014	Издательство Wiley	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,46%	0%	Frontiers Bacteriocin-Antimicrobial Sy... https://frontiersin.org	05 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,41%	0%	БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИ... http://elibrary.ru	16 Фев 2015	eLIBRARY.RU	0	1	
[59]	0,41%	0%	№ 4, июль-август http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	
[60]	0,39%	0%	Волобуева, Ольга Гавриловна Эффект... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,36%	0%	Постановление Правительства Респу... http://ivo.garant.ru	27 Фев 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,35%	0%	https://kemsu.ru/upload/iblock/1a2/1a... https://kemsu.ru	03 Фев 2022	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,35%	0%	Методика анализа и оценки деловой ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,32%	0%	High-Throughput Identification of Cand... https://frontiersin.org	09 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	
[65]	0,31%	0%	ГЕНЫ <i>>SDR</i></i>: ПАСПРОСТ... http://elibrary.ru	31 Авг 2017	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,3%	0%	Solution structure by nuclear magnetic ... https://doi.org	29 Фев 2012	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,3%	0%	Scientific Opinion on the update of the l... https://doi.org	29 Фев 2020	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,3%	0%	Skin microbiota: Microbial community s... https://ncbi.nlm.nih.gov	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,29%	0%	GRAPE: Uses, Side Effects, Interactions a... http://webmd.com	08 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,29%	0%	CHANCA PIEDRA: Uses, Side Effects, Inte... https://webmd.com	09 Янв 2018	Перефразирования по Интернету (EN)	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,29%	0%	Characterization of oral lactobacilli as p... https://doi.org	30 Апр 2008	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,29%	0%	Purification of a Bacteriocin-Like Inhibit... https://doi.org	31 Янв 2019	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,29%	0%	Diversity of Streptococcus mutans bact... http://elibrary.ru	23 Авг 2002	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,29%	0%	Health Benefits of Heat-Killed (Tyndalliz... https://ncbi.nlm.nih.gov	30 Сен 2020	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,28%	0%	Научная конференция молодых учен... http://bibliorossica.com	раньше 2011	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,28%	0%	Microbes as Drugs: The Potential of Pha... https://doi.org	29 Фев 2020	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,28%	0%	Microbes Central to Human Reproducti... https://doi.org	31 Янв 2015	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,28%	0%	Изменение свойств клубеньковых ба... http://dslib.net	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,27%	0%	Изучение влияния биопрепарата на ... https://cyberleninka.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,27%	0%	Бактериоцины как альтернатива ант... http://propionix.ru	09 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[81]	0,27%	0%	Бактериоцины как альтернатива ант... http://propionix.ru	06 Мая 2021	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[82]	0,27%	0%	Infection and Immunity Journal Homep... https://journals.asm.org	04 Фев 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[83]	0,26%	0%	«СИМБИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ КАК ИНСТ... http://ibg.anrb.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[84]	0,26%	0%	Физиолого-биохимические свойства ... http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[85]	0,26%	0%	Проблемы формирования инноваци...	22 Дек 2022	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[86]	0,26%	0%	20221028_Пособие СХБТ ред 28.10.22	31 Окт 2022	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[87]	0,25%	0%	Ученые предложат курильщикам ген... http://kazakh-zerno.kz	21 Авг 2011	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[88]	0,25%	0%	Application of Bacteriocins and Protecti... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[89]	0,25%	0%	Бактериоцины - наука биомедицины https://biomolecula.ru	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[90]	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.
[91]	0,24%	0%	Антимикробные соединения энтерок... https://cyberleninka.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,24%	0%	Антимикробные соединения энтерок... https://cyberleninka.ru	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,24%	0%	ANTIMICROBIAL AND ANTIHYPERTENSI... http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,24%	0%	Сухих, Станислав Алексеевич Теорети... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[95]	0,23%	0%	Горькова, Ирина Вячеславовна Биоте... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,23%	0%	Antimicrobial nisin acts against saliva de... https://frontiersin.org	13 Янв 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,22%	0%	248116 http://e.lanbook.com	10 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,22%	0%	Веселкин, Денис Васильевич Pinaseae... http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,22%	0%	Перспективные стратегии поиска нов... https://cyberleninka.ru	05 Мар 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,22%	0%	Коршунова, Татьяна Юрьевна Микро... http://dlib.rsl.ru	14 Июн 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,22%	0%	https://jfrm.ru/files/archive/16.pdf https://jfrm.ru	11 Мар 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,21%	0%	Нефедьева, Валентина Евгеньевна Ко... http://dlib.rsl.ru	27 Июн 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,21%	0%	http://lesgaft.spb.ru/sites/default/files/... http://lesgaft.spb.ru	17 Ноя 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,21%	0%	applied-research.ru_file_64631037b9744...	16 Мая 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,2%	0%	Правовое регулирование и юридичес... http://ivo.garant.ru	07 Мая 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,2%	0%	Plantaricin LD1 purified from Lactobacill... https://doi.org	30 Сен 2022	Издательство Wiley	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[107]	0,2%	0%	Туристско-рекреационный потенциа... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[108]	0,2%	0%	Коронавирус COVID-19 http://ivo.garant.ru	08 Фев 2020	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[109]	0,2%	0%	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХ... http://elibrary.ru	28 Авг 2014	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[110]	0,2%	0%	Коменкова, Татьяна Сергеевна Фенот... http://dlib.rsl.ru	08 Ноя 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[111]	0,19%	0%	http://kafmen.ru/library/conference/20... http://kafmen.ru	29 Мая 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,19%	0%	Purification and Partial Characterization... https://frontiersin.org	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[113]	0,18%	0%	Магомедова, Сабина Рамазановна Эк... http://dlib.rsl.ru	11 Окт 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,18%	0%	Bacteriocins: An Overview of Antimicrob... https://frontiersin.org	15 Апр 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,18%	0%	Frontiers Bacteriocins: An Overview of... https://frontiersin.org	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,18%	0%	https://dl.uctm.edu/journal/node/j2020... https://dl.uctm.edu	23 Июн 2023	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,17%	0%	Государственная фармакопея Россий... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[118]	0,17%	0%	Комментарий к Федеральному закон... http://ivo.garant.ru	13 Ноя 2021	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[119]	0,17%	0%	https://www.sechenov.ru/upload/ibloc... https://sechenov.ru	04 Апр 2022	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,16%	0%	ОПЫТ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИ... http://vestnik.mednet.ru	21 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[121]	0,16%	0%	Васильева Т.Г. Технология рецептуры...	14 Июн 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,16%	0%	АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ КОНСА... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,15%	0%	https://spbgau.ru/files/nid/7911/54-izve... https://spbgau.ru	31 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,15%	0%	Курсовая работа «Минеральное пита... https://pandia.ru	24 Дек 2021	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0,13%	0%	Lactic Acid Bacteria in Finfish-An Update https://frontiersin.org	05 Фев 2021	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,12%	0%	Source of Water and Potential Sanitizer... https://frontiersin.org	25 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[127]	0,12%	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.
[128]	0,12%	0%	Оборот фальсифицированной хлебо... http://ivo.garant.ru	02 Апр 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[129]	0,12%	0%	Bacteriocin - Wikipedia https://translated.turbopages.org	13 Мая 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.