

ISSN 0555-1099

Том 59, Номер 1

Январь - Февраль 2023



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ и МИКРОБИОЛОГИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 1, 2023

Сурфактин: биологическая активность и возможность применения в сельском хозяйстве (обзор)	
О. В. Кисиль, В. С. Трефилов, В. С. Садыкова, М. Э. Зверева, Е. А. Кубарева	3
Механизмы ростстимулирующего и защитного действия эндофитных RGP-бактерий в растениях пшеницы при воздействии засухи (обзор)	
О. В. Ласточкина, Ч. Р. Алагулова	17
Антифунгальная и реактивирующая активность нового глицин/гистидин-богатого линейного пептида из колосьев пырея ползучего (<i>Elytrigia repens</i> (L.) Desv. ex Nevski)	
Д. Ю. Рязанцев, Е. Ю. Ходжаев, А. Е. Куварица, А. С. Барашикова, Е. А. Рогожин	38
Новые ингибиторы панкреатической α -амилазы из <i>Rhaponticum uniflorum</i>	
Д. Н. Оленников, Н. И. Кащенко	46
Иммобилизация глюкозооксидазы на микросферах альгината натрия	
П. Ю. Стадольникова, Б. Б. Тихонов, Е. А. Прутенская, А. И. Сидоров, М. Г. Сульман	56
Влияние экзогенных ИУК и БАП на метаболизм клеток зоны адгезии у корней проростков гороха (<i>Pisum sativum</i> L.) в начальные периоды взаимодействия с <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	
Л. Е. Макарова, Г. П. Акимова, А. А. Ищенко, П. А. Бизиков, Т. В. Копытина	65
Новый метод экспресс-детекции антибиотикорезистентности	
С. Н. Плескова, Е. В. Лазаренко, И. С. Судакова, Р. Н. Крюков, Н. А. Безруков	74
Метод количественного определения активного рецептора бета-лактамов антибиотиков BlaR-CTD для биоаналитического применения	
Т. С. Серченя, П. А. Семижон, Е. П. Счесленок, И. В. Горбачева, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов	81
Разработка поляризационного флуоресцентного иммуноанализа сульфатазола и его применение для тестирования меда	
И. С. Нестеренко, О. Д. Гендриксон, Н. И. Смирнова, С. А. Еремин, Д. В. Сотников	96
Владимир Петрович Вейко (14.12.1952–22.10.2022 гг.)	103

CONTENTS

Vol. 59, No. 1, 2023

Surfactin: Biological Activity and the Possibility of Agriculture Application (Review) <i>O. V. Kisil, V. S. Trefilov, V. S. Sadykova, M. E. Zvereva, and E. A. Kubareva</i>	3
Mechanisms of Growth Promotional and Protective Effects of Endophytic PGP-Bacteria in Wheat Plants Under the Impact of Drought (Review) <i>O. V. Lastochkina and Ch. R. Allagulova</i>	17
Antifungal and Reactivation Activity of a Novel Glycine/histidine-rich Linear Peptide from Dog-Grass (<i>Elytrigia repens</i> (L.) Desv. ex Nevski) EARS <i>D. Yu. Ryazantsev, E. Yu. Khodzhaev, A. E. Kuvarina, A. S. Barashkova, and E. A. Rogozhin</i>	38
New Inhibitors of Pancreatic α -amylase from <i>Rhaponticum uniflorum</i> <i>D. N. Olennikov and N. I. Kashchenko</i>	46
Immobilization of Glucose Oxidase on Sodium Alginate Microspheres <i>P. Yu. Stadnikova, B. B. Tikhonov, E. A. Prutenskaya, A. I. Sidorov, and M. G. Sulman</i>	56
Effect Of Exogenous IAA and BAP on the Metabolism in the Adhesion Zone Cells of the Pea Seedling Roots (<i>Pisum sativum</i> L.) in the Initial Periods of Interaction with <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> <i>L. E. Makarova, G. P. Akimova, A. A. Ischenko, P. A. Bizikov, and T. V. Kopyrtina</i>	65
A New Method for Express Detection of Antibiotic resistance <i>S. N. Pleskova, E. V. Lazarenko, I. S. Sudakova, R. N. Kriukov, and N. A. Bezrukov</i>	74
A Method for the Quantitative Determination of the Active Receptor of Beta-lactam Antibiotics BlaR-CTD for Bioanalytical Applications <i>T. S. Serchenya, P. A. Semizhon, E. P. Schaslionak, I. V. Harbachova, I. I. Vashkevich, and O. V. Sviridov</i>	81
Development of Fluorescence Polarization Immunoassay of Sulfathiazol and its Application for Honey Testing <i>I. S. Nesterenko, O. D. Hendrickson, N. I. Smirnova, S. A. Eremin, and D. V. Sotnikov</i>	96

УДК 579.222, 579.64, 504.062

СУРФАКТИН: БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ (ОБЗОР)

© 2023 г. О. В. Кисиль^{1, *}, В. С. Трефилов², В. С. Садыкова¹, М. Э. Зверева², Е. А. Кубарева³

¹Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

²Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: olvv@mail.ru

Поступила в редакцию 12.08.2022 г.

После доработки 30.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Обобщена и проанализирована актуальная информация о сурфактине — циклическом липопептиде, одном из наиболее изученных микробных биосурфактантов. Представлены механизм биосинтеза сурфактина, спектр его природных и синтетических изоформ, биологическая активность сурфактина и его роль в регуляции процессов жизнедеятельности продуцентов. Продемонстрирован потенциал использования сурфактина и биопрепаратов, полученных на основе бактерий рода *Bacillus* — продуцентов сурфактина, для защиты и стимуляции иммунитета растений.

Ключевые слова: сурфактин, *Bacillus* spp., защита растений

DOI: 10.31857/S0555109923010026, **EDN:** CPUNHX

Стратегии микробного контроля с использованием антибиотиков постоянно сталкиваются с проблемой появления резистентных бактериальных штаммов, в том числе встроенных в биопленочные образования. В последние годы внимание исследователей приковано к бактериальным поверхностно-активным веществам — биосурфактантам — гетерогенной группе амфифильных соединений: с гидрофильными (аминокислотными или пептидными; ди- или полисахаридными; анионными или катионными) и гидрофобными (остатками насыщенных или ненасыщенных алифатических кислот) фрагментами, которые, непосредственно взаимодействуя с компонентами матрикса патогенных бактерий и грибов, изменяют физические свойства поверхности биопленки и иницируют ее деградацию. Было показано, что диспергирующие свойства биосурфактантов в отношении бактериальных и дрожжевых биопленок, а также мембранных структур вирусов не уступают таковым современных фармпрепаратов. Это делает их потенциальными кандидатами для использования в качестве антимикробных агентов нового поколения и/или в качестве адъювантов для других антибиотиков. Микробные биосурфактанты имеют ряд преимуществ в сравнении с синтетическими поверхностно-активными веществами (ПАВ): биоразлагаемость, низкая токсичность и физико-химическая стабильность в условиях высоких

температур или экстремальных значений pH среды [1]. Некоторые биосурфактанты в настоящее время используются в клинической, пищевой, фармацевтической и экологической сферах, в то время как другие пока остаются на стадии изучения и разработки.

Сурфактин является наиболее изученным представителем биосурфактантов, продуцируемых *Bacillus* spp. [2]. В 1968 г. Арима с соавт. [3] в процессе исследований, посвященных изучению влияния микробных метаболитов на фибринолитическую систему и систему свертывания крови, обнаружили мощный ингибитор свертывания, секретируемый в культуральную жидкость несколькими штаммами *Bacillus subtilis*. Ингибитор был выделен в виде белых игольчатых кристаллов и из-за его высокой поверхностной активности, превышающей таковую для лаурилсульфата натрия, был назван “Сурфактин” (“Surfactin” от английского surface-active). В Японии он запатентован как мощный биосурфактант, ингибирующий образование тромбов [4]. На сегодняшний день установлено, что сурфактин продуцируется несколькими видами рода *Bacillus*, включая *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. natto*, *B. tequilensis*, *B. inaquosorum*, *B. spizizenii*, *B. vallismortis* *B. subtilis* subsp. *subtilis* и *B. velezensis* (The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

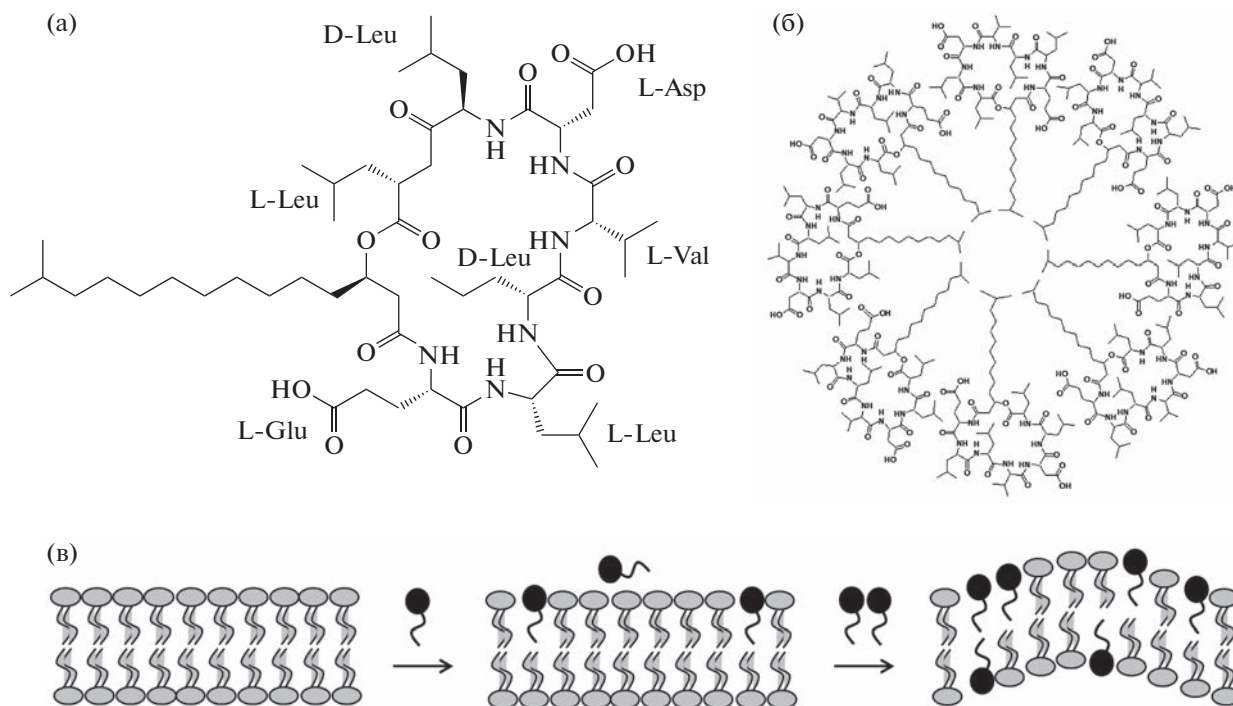


Рис. 1. Сурфактин, структура и взаимодействие с мембраной клетки: а — структурная формула сурфактина; б — предполагаемое строение мицеллы, образованной из молекул сурфактина (адаптировано из [2]); в — схематическая модель дестабилизации фосфолипидной мембраны (липиды показаны серым цветом) молекулами сурфактина (черный цвет), адаптировано из [16].

[5–7]. Исследование 35 штаммов дикого типа и коммерческих продуцентов, проведенное Хсе и соавт. [8], показало, что среди всех культур штаммы дикого типа *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis* отличаются наиболее высоким уровнем производства сурфактина — 452.5 и 125.6 мг/л соответственно.

Сурфактин является амфифильной молекулой, что обуславливает его уникальные физико-химические свойства: способность к пенообразованию, эмульгированию, модификации гидрофобных поверхностей и хелатированию [9, 10]. Он может диспергировать нефтяные разливы на поверхности воды, увеличивая эффективность их утилизации аборигенными морскими микроорганизмами, а также улучшать адгезию бактерий к нефтяному пятну для повышения продуктивности биоремедиации [11]. Эмульгирующие свойства сурфактина предполагают возможность применения его в косметической промышленности и бифармацевтике [12]. Показано, что сурфактин индуцирует цитотоксичность в отношении клеточных линий многих типов злокачественных образований, таких как рак груди и толстой кишки, лейкоemia и гепатома [2]. Амфифильная природа сурфактина позволяет легко вводить его в нанопрепараты (полимерные наночастицы, мицеллы, микроэмульсии, липосомы), что позволяет оптимизировать доставку сурфактина в злокачествен-

ные образования и повысить эффективность противоопухолевой терапии. К сожалению, коммерческий потенциал сурфактина в качестве терапевтического агента не может быть полностью реализован из-за его гематотоксичности, выражающейся в гемолизе эритроцитов.

Структурное разнообразие сурфактина. Первоначально структура сурфактина была установлена путем гидролиза молекулы на фрагменты с последующей их идентификацией и определением порядка следования сначала по аминокислотной последовательности, а затем по цепи алифатических кислот [13, 14]. Сурфактин состоит из замкнутой пептидной цепи, образованной семью остатками α -аминокислот, соединенной с остатком β -гидроксиалифатической кислоты. Типичная последовательность аминокислотных остатков в циклопептидном фрагменте (рис. 1а) следующая: L-Glu1-L-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7 [15]. Отметим, что в положениях 3 и 6 находятся аминокислотные остатки в D-форме. Полярная часть сурфактина состоит из двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков Glu и Asp (в природном сурфактине).

Изучение трехмерной структуры сурфактина методом ^1H ЯМР показало наличие минорного полярного и основного гидрофобного доменов. Минорный домен образован основной цепью

циклического пептида и двумя его отрицательно заряженными аминокислотными остатками — Glu1 и Asp5. Гидрофобный домен образован углеводородной цепью остатка жирной кислоты и аминокислотами Leu2, Leu3, Val4, Leu6, Leu7. Такая двудоменная структура обуславливает амфифильный характер сурфактина и, как следствие, высокую поверхностную активность [15]. Основываясь на данных спектроскопии кругового дихроизма и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, Васс с соавт. [17] показали, что сурфактин в растворе обладает значительной способностью к самосборке с образованием мицелл и более крупных агрегатов, при этом на морфологию образующихся мицелл заметно влияют условия окружающей среды, такие как pH, ионы металлов и температура (рис. 16).

Относительная сложность и вариабельность структуры определяет сосуществование большого количества изомеров сурфактина в образцах, выделяемых из культуральной жидкости бактерий [18]. Из-за широкого круга изомеров молекулярная масса сурфактинов варьируется в диапазоне 993–1049 Да [5]. Основные структурные аналоги сурфактина можно разделить на 2 группы: (1) изомеры, отличающиеся аминокислотной последовательностью гидрофильной “головы” и (2) изомеры, отличающиеся количеством атомов углерода в алифатической части жирной кислоты, то есть длиной “хвоста”. Компьютерный анализ кластеров генов вторичных метаболитов показал, что большинство вариантов сурфактина, кодируемых в геномах представителей рода *Bacillus*, различаются по положению 1 и 7 пептидного кольца. Гены биосинтеза сурфактина из *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* — в положении 7 Leu, из *B. atrophaeus* — Ile, а из *B. licheniformis* — кодируют Gln и Ile в положениях 1 и 7 соответственно [19]. Были идентифицированы природные изоформы сурфактина с вариациями гидрофобных аминокислотных остатков в положениях 2 (Leu меняется на Val или Ile) и 4 (Val меняется на Leu, Ala или Ile) [5]. Гидрофильный остаток аспарагинового кислоты в положении 5 может подвергаться модификации: он метилируется и превращается в относительно гидрофобный 4-метиловый эфир аспарагиновой кислоты [20]. Предположительной причиной такого широкого спектра вариаций могут быть аминокислотные замены в доменах аденилирования субъединиц сурфактинсинтетазы (см. раздел “Биосинтез сурфактина”) [21].

Длина гидрофобного “хвоста” сурфактина также подвержена изменению: она может составлять от 13 до 18 атомов углерода. Основные изоформы имеют 14 и 15 атомов углерода [5]. Варьироваться может не только длина углеводородной цепи, но и ее разветвленность. Показано существование изомеров *изо*-C12, *изо*-C13, *антеизо*-C13, *изо*-C14,

н-C14, *изо*-C15, *н*-C15, *антеизо*-C15, *антеизо*-C16 и *антеизо*-C17 [22].

На соотношение различных изомеров в синтезируемом бактериями сурфактине можно влиять путем изменения условий культивирования, а именно добавления в питательную среду различных низкомолекулярных соединений. Бартал и соавт. [5] показали, что изоформный состав сурфактина зависит от источника углерода в питательной среде, при этом наибольший эффект наблюдался при использовании фруктозы и ксилозы. Введение в культуральную жидкость ионов металлов Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ni^{2+} приводит к образованию как новых метилированных по аспартату форм сурфактина, так и изомеров с более длинными цепями жирных кислот: две трети молекул были гомологами C16, C17 или C18. Смежные исследования в этой области показали, что присутствие аминокислот в питательной среде также влияет на изомерный состав синтезируемого сурфактина [22]. Так, при добавлении в питательную среду *B. subtilis* TD7 аминокислот Arg, Gln или Val возрастает доля изомеров сурфактина с четной длиной гидрофобного “хвоста”, тогда как добавление Cys, His, Ile, Leu, Met, Ser, или Thr способствует увеличению доли изомеров с нечетной длиной “хвоста”.

Взаимосвязь структура — активность сурфактина. Различия в структуре — длине и строении углеводородного “хвоста”, а также аминокислотном составе — оказывают влияние на биологическую активность сурфактинов. Показано, что с увеличением длины цепи поверхностная и межфазная активность сурфактинов увеличивается, поэтому липопептид с короткой углеводородной цепью имеет тенденцию к образованию небольших мицелл, в то время как при увеличении длины цепи наблюдается тенденция к укрупнению мицелл и их агрегированию (рис. 16) [15]. Степень проникновения сурфактина в фосфолипидную мембрану клетки прямо пропорциональна длине углеводородной цепи. Показано, что сурфактин с “хвостом” C15 обладает большей противоопухолевой активностью, чем с углеводородной цепью C13 и C14 [23]. Аналогичные данные были получены и при инаktivации сурфактином оболочечных вирусов. Сурфактин C13 показал очень низкую противовирусную активность по сравнению с изоформами C14 и C15 [24]. К сожалению, с увеличением гидрофобности жирных кислот (длины “хвоста”) увеличивалась не только противовирусная активность, но и гемолитическое действие сурфактина.

Критичной для адсорбции сурфактина на липидной поверхности и его проникновения в липидную пленку оказывается и цикличность пептидного фрагмента. Показано, что линейный сурфактин, полученный путем химического расщепления цикла, обладает меньшей поверхностной актив-

ностью, чем природный сурфактин [25]. Что же касается роли природы аминокислотных остатков в биологической активности сурфактина, результаты экспериментов показали, что поверхностная активность повышается, а критическая концентрация мицеллообразования снижается при замене аминокислот на более гидрофобные [15]. Значимую роль в амфифильных свойствах сурфактина играют два отрицательно заряженных остатка Glu и Asp. Показано, что природный метилированный по Glu сурфактин C15 (C15-сурфактин-О-метиловый эфир) обладает более высокой поверхностной активностью и меньшим противоопухолевым действием, чем C15-сурфактин [26]. Если остатки Glu или Asp метилированы или амидированы, то активность сурфактина по снижению поверхностного натяжения увеличивается на 20%, несмотря на то, что растворимость липопептида в воде при этом уменьшается. При модификации остатков Glu1 и Asp5 аминотансульфоновой кислотой поверхностная активность сурфактина резко снижалась из-за электростатических и стерических факторов [26].

Исследования показывают, что структуру сурфактина можно модифицировать для усиления его желательных и ослабления нежелательных эффектов. Одним из основных недостатков использования сурфактина в качестве противоопухолевого и антибактериального препарата является его гемолитическая активность. Для ее преодоления, были разработаны линейные формы сурфактина, для которых, в отличие от циклических форм, не наблюдается значительного гемолиза [28]. Варианты сурфактина, у которых в кольце отсутствуют остатки Leu3 или Leu6, также демонстрируют пониженную гемолитическую активность. В то же время сурфактин без Asp5 сохраняет гемолитические свойства, но демонстрирует лучшие, по сравнению с природным сурфактином, антибактериальные свойства в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus*. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), подавляющая развитие данных патогенов, составила 25 мкг/мл для сурфактина без Asp5 и 50 мкг/мл для нативного сурфактина [29].

Биосинтез сурфактина. Известно, что вторичный метаболический аппарат бактерий организован в кластеры генов, внутри которых в непосредственной близости друг от друга располагаются гены, отвечающие за биосинтез продуцируемых бактериями соединений [30]. Подобный кластер для сурфактина был описан параллельно разными группами ученых [31]. В базе данных (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster, <http://mibig.secondarymetabolites.org>) зарегистрирован кластер генов биосинтеза сурфактина для *Bacillus velezensis* FZB42 (идентификатор MiBIG: BG0000433) [32].

Биосинтез сурфактина, как и большинства других циклических липопептидов, осуществляется по нерибосомальному механизму с помощью специальных систем — нерибосомальных пептидных синтетаз (НРПС). НРПС представляют собой мультиферментные комплексы, которые условно можно разделить на модули — участки НРПС, отвечающие за встраивание определенной аминокислоты в пептидную цепь [2, 6]. В свою очередь, каждый модуль может быть разделен на несколько доменов: домен аденилирования (А), домен тиолирования (Т) и домен конденсации (С). А-домен отвечает за узнавание и активацию конкретной аминокислоты за счет образования аминокислотаденилата (процесс аналогичен активации карбоксильной группы аминокислоты тРНК-синтетазой при рибосомальном пептидном синтезе). Далее подвижная и гибкая 4'-фосфопантетиновая часть Т-домена образует тиоэфирную связь с карбоксильной группой аминокислоты, и за счет своей относительно большой длины (20 Å) переносит аминокислотный остаток из активного центра Т-домена к С-домену. С-домен, в свою очередь, катализирует образование новой пептидной связи и перемещение удлиненного пептида к следующему модулю (рис. 2) [31]. Линейное расположение нескольких таких модулей в виде сборочной линии обеспечивает координированное удлинение пептидной цепи. После модулей 3 и 6 дополнительно имеются домены эпимеризации (Е-домены), отвечающие за изомеризацию остатков природного L-Leu, связанного с Т-доменом в 3 и 6 модулях, в D-изомеры, так как молекула сурфактина содержит именно D-Leu в этих положениях. В большинстве случаев нерибосомальный синтез пептида завершается макроциклизацией, при этом части молекулы, удаленные в построенной линейной пептидной цепи, ковалентно связываются друг с другом. Процесс циклизации чаще всего катализируется тиюэстеразными доменами на С-конце сборочной линии НРПС. Остаток β-гидроксилифатической кислоты, содержащийся в сурфактинах и других микробных липопептидах, встраивается в молекулу в начале биосинтеза. В стартовом модуле НРПС на N-конце имеется дополнительный домен (С*), отвечающий за образование связи между CoA-активированным остатком β-гидроксилифатической кислоты с первой аминокислотой.

Гены, кодирующие субъединицы НРПС сурфактина — *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* и *srfAD* — объединены в единый оперон *srfA* (рис. 3). Белки SrfAA и SrfAB состоят из трех модулей, а SrfAC — из одного модуля и тиюэстеразного (ТЕ) домена, отвечающего, как упоминалось выше, за высвобождение гептапептидной цепи и ее макроциклизацию. Кроме того, субъединица SrfAA содержит на N-конце также уже упоминавшийся дополнительный домен, катализирующий присоединение к первой

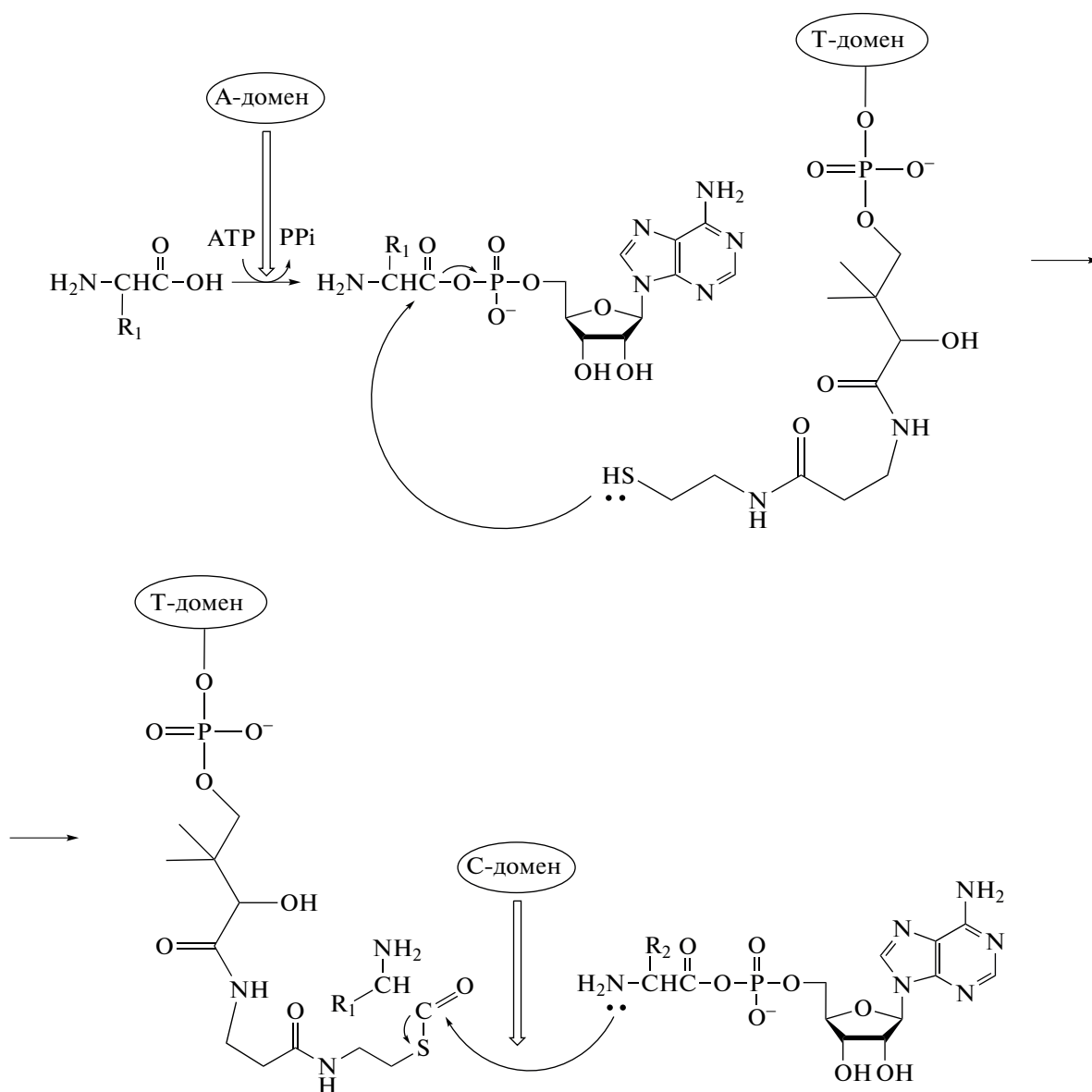


Рис. 2. Схема реакции биосинтеза сурфактина одним из модулей нерибосомальных пептидных синтетаз. R₁ и R₂ – боковые цепи аминокислотных остатков.

аминокислоте (в случае сурфактина это чаще всего Glu) липофильного “хвоста”, остатка β-гидроксиалифатической кислоты. SrfAD представляет собой TE-домен и отвечает за регенерацию ошибочно связанных Т-доменов в модулях первых трех субъединиц [31].

Все 4 гена, кодирующие НРПС сурфактина, включены в один оперон *srfA*, транскрипция которого контролируется промотором P_{srfA}. Активность P_{srfA}, в свою очередь, регулируется транскрипционным фактором ComA, являющимся частью двухкомпонентной системы ComP/ComA. Когда концентрация бактериальных клеток *B. subtilis* достигает определенного значения, мембранная

гистидиновая киназа ComP фосфорилирует белок ComA, в результате он активируется и индуцирует транскрипцию оперона *srfA*, инициируя биосинтез сурфактина. В работе [33] промотор P_{srfA}, активность которого, из-за зависимости от концентрации клеток в окружающей среде, непостоянна во времени, был заменен на нативный конститутивный промотор P_{veg}, содержащийся в геноме *B. subtilis*, с целью повышения количества синтезируемого сурфактина. Оказалось, что подобная замена приводит к повышению синтеза сурфактина только в малоэффективных штаммах-продуцентах, а в штаммах с повышенным природным производством сурфактина, его вы-

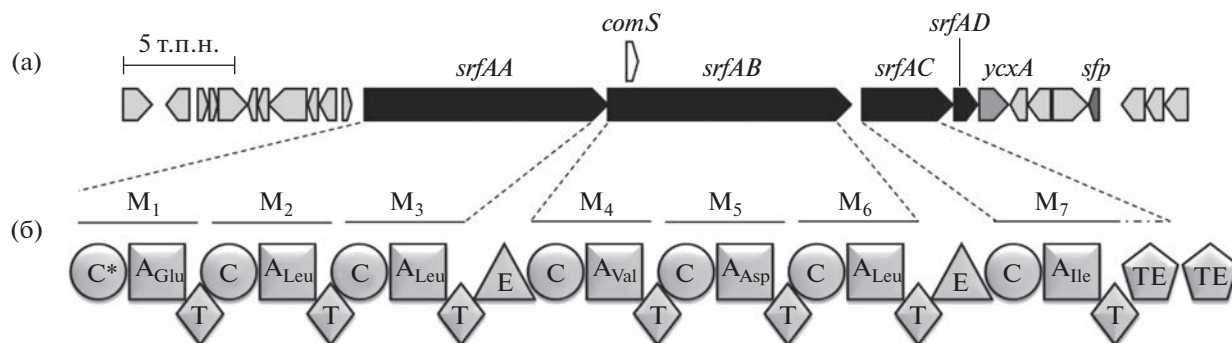


Рис. 3. Кластер генов белков, ответственных за биосинтез сурфактина (а) и классическая схема сборочной линии сурфактина (б). Гены субъединиц НРПС выделены черным; М — модуль сборочной линии; остальные гены кластера обозначены серым. Масштаб размера генов кластера приведен в тысячах п.н. Регуляторный ген *comS* транскрибируется совместно с *srfAB*; (адаптировано из [31]).

ход падает. В другой работе группа ученых заменила промотор P_{srfA} в штамме-продуcente *B. subtilis* ТНУ-7 на другой “сильный” природный для штамма *B. subtilis* ТНУ-7 промотор P_{groE} , однако получила тот же результат — производство сурфактина в модифицированном штамме заметно уменьшилось. Вместе с тем, при замене P_{srfA} на искусственный промотор P_{g3} , индуцируемый экзогенно изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), производство сурфактина возросло в 18 раз по сравнению с нативным штаммом [34].

Помимо структурных генов сурфактинсинтазы кластер биосинтетических генов сурфактина включает один встроенный и несколько смежных дополнительных генов, кодирующих транспортеры и регуляторные белки (рис 3, верхняя панель, серые стрелки) [32]. Среди них следует отдельно выделить гены *sfp*, *yscA*, *krsE*, *yerP* и *comS*, транскрипция которых напрямую связана с эффективностью производства сурфактина. Особого внимания заслуживает ген *sfp*, кодирующий фосфоантетеинилтрансферазу — фермент, катализирующий перенос остатка фосфоантетеинила на неактивный Т-домен субъединиц НРПС и тем самым активирующий их [35]. Показано, что наличие интактного гена *sfp* в геноме бактерии строго необходимо для производства сурфактина. Так, штамм *Bacillus subtilis* 168, который систематически использовался в качестве модельной системы для грамположительных организмов, не производит сурфактин, при этом гены оперона *srfA* идентичны генам в штаммах-продуцентах сурфактина. Выяснилось, что у *B. subtilis* 168 вследствие мутации в гене *sfp* появился один лишний нуклеотид (А в позиции 634), что вызвало инактивацию белка Sfp и блокирование синтеза сурфактина. При этом его производство восстанавливается при внесении в штамм *B. subtilis* 168 вектора, содержащего интактный ген *sfp*, выделенный из штамма-продуцента [36]. Немаловажную роль как в процессе биосинтеза сурфактина,

так и в механизме устойчивости клеток-продуцентов к нему, играет система экспорта сурфактина через мембрану, позволяющая избежать внутриклеточного накопления сурфактина. Были идентифицированы три гена, которые участвуют в оттоке сурфактина: *yscA*, *krsE*, и *yerP* [37]. Показано, что основным экспортером является белок Yerp, повышение экспрессии которого увеличивает количество сурфактина в культуральной жидкости на 145% [37].

Ген *comS*, расположенный внутри оперона *srfA* в открытой рамке считывания гена *srfAB*, кодирует белок ComS, имеющий несколько функций. С одной стороны, ComS участвует в положительной регуляции генетической компетентности клетки (способность захватывать экзогенный генетический материал и ассимилировать его), а с другой стороны, является частью системы *comQXPA*, отвечающей за распознавание окружающих клетку родственных бактерий (“quorum sensing”) и регулирующей биосинтез сурфактина [33, 38].

Биологическая активность сурфактина. Сурфактин как поверхностно-активное вещество. Биосурфактанты, обладая свойствами ПАВ, могут изменять условия на границах раздела двух фаз, различающихся полярностью и количеством водородных связей (например, вода/масло или вода/воздух) [2]. Существует два предполагаемых механизма влияния биосурфактантов на жизнеспособность клеток-продуцентов: (1) повышение способности к эмульгированию, что, в свою очередь, увеличивает доступность гидрофобных соединений в качестве источника питательных веществ и (2) помощь в прикреплении и отделении микроорганизмов от поверхностей [6]. Сурфактин известен как один из самых мощных ПАВ. Он снижает поверхностное натяжение воды с 72 до 27 мН/м при концентрации всего 10 мкМ, что намного ниже его критической концентрации мицеллообразования в воде (23 мг/л) и примерно на два порядка меньше, чем для большинства мою-

щих средств [39]. Мозаичное распределение полярности и разветвленная кольцевая структура позволяют сурфактину принимать сферическую, мицеллярную структуру для облегчения плотной упаковки на границах раздела фаз (рис. 16). В среднем масса мицеллы 179000, число агрегации $n = 173$ [40]. Липидный “хвост”, свободно движущийся в растворе, активно участвует в гидрофобных взаимодействиях в супрамолекулярных структурах на границе раздела вода/воздух. Молекулы сурфактина на границе раздела фаз очень тесно выстроены, при этом адсорбционные свойства сурфактина зависят не только от концентрации, но и от длины углеводородной цепи [15].

Сурфактин в “quorum sensing”. Бактериальные сообщества могут чувствовать изменения окружающей среды и соответствующим образом корректировать свое поведение с помощью системы распознавания кворума. Этот процесс зависит от плотности клеток и регулируется сигнальными молекулами — аутоиндукторами. Концентрация последних повышается во внеклеточной среде по мере того, как увеличивается плотность бактериальных клеток, и, когда она достигает определенного порогового уровня, группа клеток начинает действовать синхронно. Сигнальные молекулы приводят к дифференцировке клеток в различные типы для адаптации к изменениям окружающей среды. Например, при неблагоприятных условиях сурфактин инициирует развитие субпопуляции *B. subtilis*, известной как каннибалы. Они выделяют особые токсины, которые разрушают соседние клетки, при этом сами клетки-каннибалы к токсинам невосприимчивы. Предполагается, что сурфактин является сигнальной молекулой в микробной коммуникации и участвует в активации гистидинкиназы сенсорного рецептора, ассоциированной с мембраной (KinC). В свою очередь, KinC активирует экспрессию гена белка раннего спорообразования Spo0A, что в конечном итоге активирует споруляцию, образование биопленок и колонизацию корней растений [41].

Сурфактин и дестабилизация биологических мембран. Биологическая активность сурфактина связана с его взаимодействием с липидной частью биологических мембран всех видов бактерий. Благодаря своей амфифильной структуре, молекулы сурфактина могут легко встраиваться в липидные слои и прочно закрепляться там: гидрофобная часть сурфактина взаимодействует с углеводородными цепями фосфолипидов мембраны, а пептидная часть — с полярными группами липидов (рис. 1в). Проникновение сурфактина в фосфолипидный бислой приводит к нарушениям и/или созданию каналов в цитоплазматической мембране, что, в свою очередь, может активировать каскад молекулярных событий, приводящих к защитным реакциям [23, 42]. Сурфактин деста-

билизирует мембрану с помощью нескольких механизмов: (1) встраивание в липидные бислои, (2) образование каналов/пор или диффузия одно- и двухзарядных ионов через мембранный барьер и (3) солюбилизация мембраны подобно действию детергента. Какой именно механизм будет задействован, зависит от концентрации сурфактина [43]. Показано, что при низкой концентрации антимикробные пептиды склонны проникать в мембрану и встраиваться в липидный бислой [44]. Это вызывает образование однослойных везикул на внешней мембране, приводя к деформации клетки и, в конечном итоге, к ее гибели (рис. 1в) [45].

С увеличением концентрации сурфактин начинает образовывать агрегаты в липидном бислое, создавая поры в клеточной мембране. Образовавшиеся поры дают возможность для выхода нуклеиновых кислот, незаменимых ионов и АТФ из клетки, приводя к ее гибели. Показано, что ионы Ca^{2+} помогают более глубокому проникновению сурфактина в мембрану за счет нейтрализации зарядов как сурфактина (экранирование отрицательных зарядов остатков Glu1 и Asp5 пептидного цикла), так и заряженных частей липидов [46, 47]. При высоких концентрациях преобладает детергентный механизм разрушения мембраны, основой которого является солюбилизация фосфолипидов молекулами сурфактина, при этом степень проникновения сурфактина прямо пропорциональна длине “хвоста”. Лю с соавт. [48] показали, что сурфактин ингибирует образование биопленки *Staphylococcus aureus* за счет снижения процентного содержания растворимых в щелочной среде полисахаридов и подавления экспрессии генов *ica A* и *icaD*, участвующих в формировании биопленки.

Сурфактин в образовании биопленок и колонизация корней растений. *B. subtilis* — это подвижная грамположительная спорообразующая факультативная аэробная почвенная бактерия. Для рода *Bacillus* миграция клеток по поверхности сред, роение, а также способность к колонизации корней растений путем образования на их поверхности биопленок напрямую связаны с производством сурфактина [6, 49]. В неподвижной субпопуляции *B. subtilis* сурфактин посредством взаимодействия с KinC активирует транскрипцию гена белка Spo0A, что приводит к изменению моторно-роторных жгутиковых механизмов [38, 50]. Сурфактин способствует смачиваемости гидрофобной кутикулы растения, что способствует не только увеличению подвижности бактериальных клеток, но также растворимости и диффузии субстратов для роста. Показано, что сурфактин может изменять вязкость поверхностей, тем самым влияя на подвижность клеток [51, 52]. Анализ генома штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42, коммерчески используемого в качестве биоудобрения в

сельском хозяйстве и представляющего собой модельную бактерию для изучения взаимодействий с растениями, показал, что почти 10% генома этого продуцента связано с синтезом антимикробных метаболитов [53]. При этом исследования на растениях демонстрируют, что, за исключением сурфактина, количество антимикробных метаболитов, обнаруживаемых вблизи корней растений, относительно невелико. Таким образом, именно сурфактины позволяют колониям бактерий р. *Bacillus* образовывать биопленки [54].

Бактерии инициируют образование биопленки в ответ на определенные сигналы окружающей среды, такие как доступность питательных веществ и кислорода. При переходе от свободноживущих организмов к неподвижным колониям в биопленке они претерпевают динамические изменения, включая специфическую продукцию вторичных метаболитов и значительное повышение устойчивости к биологическим, химическим и физическим воздействиям. Опыт успешного использования сурфактина для повышения устойчивости растений к патогенам в лабораторных условиях суммирован в табл. 1. Известно, что сурфактин влияет на способность *B. subtilis* стимулировать развитие растений через формирование биопленки [55]. Териев с соавт. [56] показали, что продукция сурфактина не является принципиальной для формирования биопленки, но отсутствие сурфактина снижает разрастание колоний *B. subtilis*.

Базис с соавт. [59] продемонстрировали способность сурфактина из *B. subtilis* колонизировать корни арабидопсиса с образованием стабильной биопленки и, таким образом, защищать их от *Pseudomonas syringae* как *in vitro*, так и в почве МИК сурфактина в отношении *P. syringae* составила 25 мкг/мл, что является относительно высоким для противомикробного агента, но приемлемо для коммерческого биопестицида. В экспериментах с корнями *Arabidopsis*, которые были предварительно инокулированы суспензией *B. subtilis*, уровни сурфактина в промытых корнях были значительными: 151.6 мкг/мл на 50 мг сырого веса корней. Возможно, что на поверхности корня концентрация растворенного сурфактина значительно выше, чем МИК против *P. syringae*, определенная *in vitro*. Интересно, что после инокуляции патогенным штаммом *P. syringae* продукция сурфактина увеличивалась примерно в два раза. Авторы протестировали мутантный штамм с делецией в гене *sfp*, дефицитный по продукции сурфактина. Он был неэффективен в качестве средства биологической борьбы с *P. syringae* и не образовывал прочных биопленок ни на корнях арабидопсиса, ни на инертных поверхностях. Аналогичные результаты были получены и Луо с соавт. [61], которые получили мутантные штаммы *B. subtilis* 916 с делециями в гене первой субъединицы НРПС сурфактина *srf4A*.

B. subtilis 916 является ключевым компонентом популярного в Китае коммерчески доступного биофунгицида “Wenqunling”. Мутантные дефицитные по продукции сурфактина штаммы продемонстрировали изменение роевой подвижности, снижение антагонистической активности и уменьшение эффективности образования биопленки [61]. При этом роевая подвижность восстанавливалась при добавлении сурфактина в дозе 10 мкг/мл, в то время как образование биопленок не удалось восстановить даже при добавлении дозы 50 мкг/мл. В работе Фан с соавт. [62] мутантный штамм *B. subtilis*, со сниженной выработкой сурфактина, показал уменьшение образования биопленки, снижение роевой подвижности и не проявлял способности ингибировать рост *Acidovorax citrulli* [62].

Изоформы сурфактина видоспецифичны и опосредуют конкретную для каждого вида передачу сигналов, приводящую к различному экологическому поведению. Мутантный штамм *B. atrophaeus* со сниженной выработкой сурфактина реагировал на экзогенный родственный сурфактин С, полученный из нативного штамма, образуя прочные биопленки, в то время как в присутствии сурфактина А, производимого *B. subtilis*, наблюдалась только разреженная биопленка [21]. Аналогично, родственный сурфактин А вызывал устойчивые биопленки у дефицитного по сурфактину штамма *B. subtilis*, в то время как сурфактин С, полученный из *B. atrophaeus*, индуцировал у *B. subtilis* разреженные биопленки.

В работе Дэбоиз с соавт. [73] показано, что сурфактин является основным бактериальным метаболитом, накапливающимся в растениях в течение первых часов взаимодействия бактерии с корнями растения. Синтез сурфактина специфически стимулируется при взаимодействии бактерий с полимерами клеточных стенок растения: ксиланом или арабиногалактаном, что приводит к быстрому накоплению микромолярных количеств липопептида в корневой системе. При таких концентрациях сурфактин не только усиливает способность штамма-продуцента колонизировать корни, но и активирует индуцированную системную устойчивость растения-хозяина.

Сурфактин и индуцированная системная устойчивость растений. Помимо прямого антагонизма, некоторые бактерии могут защищать растения косвенно, стимулируя индуцируемые защитные механизмы, которые делают растение-хозяина более устойчивым к проникновению патогена. Такая индуцируемая защита проявляется на протяжении всего онтогенеза и по своей природе близка к естественным иммунным реакциям. Описываемое явление получило название индуцированной системной устойчивости (induced systemic resistance, ISR). Считается, что сурфактин не вызывает защитного ответа растений, свя-

Таблица 1. Использование сурфактина для повышения устойчивости растений к патогенам

Штамм	Действующий липопептид	Объект защиты	Способ обработки	Патоген	Ссылка
Защита растений от патогена вследствие прямого антимикробного действия					
<i>B. subtilis</i> RB14	Смесь липопептидов: итурина и сурфактина	Томат (листья)	Инокуляция почвы до посадки проросших семян, обработка растений	<i>Rhizoctonia solani</i>	[57]
<i>B. subtilis</i> GA1	Смесь липопептидов: итурина, фенгигина и сурфактина	Яблоки (плоды)	Обработка плодов	<i>Botrytis cinerea</i>	[58]
<i>B. subtilis</i> 6051	Сурфактин	Арабидопсис (корни)	Инокуляция корней и почвенного грунта	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	[59]
<i>B. subtilis</i> UMAF6614	Смесь липопептидов: бацилломицина, фенгигина и сурфактина. (Показано, что сурфактин основной детерминатор атипатогенного ответа)	Дыня (листья)	Опрыскивание листьев	<i>Podosphaera fusca</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i>	[60]
<i>B. subtilis</i> 916	Смесь изоформ сурфактина от C13 до C15	Рис (стебель, листья)	Опрыскивание стеблей и листьев	<i>Rhizoctonia solani</i>	[61]
<i>B. atrophaeus</i> 176s, <i>B. atrophaeus</i> 1942, <i>B. subtilis</i> OKB105, <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	Сурфактины А, В и С. Смесь изоформ от C13 до C16	Помидоры (корни), салат (корни), сахарная свекла (корни)	Обработка корней	<i>Rhizoctonia solani</i>	[21]
<i>B. subtilis</i> 9407	Сурфактин А. Смесь изоформ от C13 до C16	Дыня (листья)	Замачивание проросших семян	<i>Acidovorax citrulli</i>	[62]
<i>B. velezensis</i> Bvel1	Смесь липопептидов: итурина А2, изоформ сурфактина C13 и C15, оксидифицилина, бацилликапина, L-дигидроан-тикапсина	Виноград (грозди)	Обработка ягод	<i>Botrytis cinerea</i>	[63]
Стимулирование индуцированной системной устойчивости растений к заболеваниям					
<i>B. subtilis</i> 2500, <i>B. subtilis</i> 2508	Смесь изоформ от C13 до C15	Фасоль (листья), томат (листья)	Обработка семян. Добавление бактериальной суспензии в почву и прикорневая поливка через неделю	<i>Botrytis cinerea</i>	[42]

Таблица 1. Окончание

Штамм	Действующий липопептид	Объект защиты	Способ обработки	Патоген	Ссылка
<i>B. subtilis</i> UMAF6639	Смесь липопептидов, включая сурфактин. Показано, что сурфактин является основной детерминантой стимуляции иммунного ответа	Тыква (листья)	Инокуляция корней и прикорневая поливка через неделю	<i>Podosphaera fusa</i>	[64]
<i>B. amyloliquefaciens</i> S499	Смесь липопептидов: итурина, фенгицина и сурфактина	Сахарная свекла (корни)	Полив растений	<i>Polymyxa betae</i>	[65]
<i>B. amyloliquefaciens</i> S499, <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42, <i>B. amyloliquefaciens</i> QST713, <i>B. subtilis</i> 98S	Сурфактин	Томат (листья), табак (листья)	Добавление сурфактина в гидропонный раствор	<i>Botrytis cinerea</i>	[66]
<i>B. subtilis</i> ABS-S14	Сурфактин. (Показан синергизм смеси липопептидов: итурина, фенгицина и сурфактина)	Апельсин (плоды)	Обработка плодов	<i>Penicillium digitatum</i>	[67]
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42-AK3	Смесь изоформ сурфактина от C12 до C15	Пастбищный райграс (листья)	Замачивание семян в суспензии бактериальных клеток/ растворе сурфактина. Добавление бактериального инокулята/ раствора сурфактина в почву и прикорневая поливка через 3 недели	<i>Magnaporthe oryzae</i>	[68]
<i>B. amyloliquefaciens</i> S13-3	Смесь липопептидов, включая сурфактин Коммерческий препарат сурфактина	Земляника (листья)	Опрыскивание листьев	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	[69]
<i>B. subtilis</i>	Коммерческий препарат сурфактина	Арахис (стебель)	Погружение корней проростков в раствор сурфактина	<i>Sclerotium rolfsii</i>	[70]
<i>B. subtilis</i> 26Д	Сурфактин	Пшеница (листья)	Замачивание семян	<i>Septoria nodorum</i>	[71]
<i>B. subtilis</i> GLB19.1	Смесь липопептидов: сурфактина и фенгицина	Виноград (листья)	Опрыскивание листьев	<i>Plasmopara viticola</i>	[72]
<i>B. velezensis</i> BBC023, <i>B. velezensis</i> BBC047	Смесь изоформ сурфактина от C12 до C17	Томат (корни, листья)	Инокуляция поверхности корней или листьев	<i>Botrytis cinerea</i>	[49]

занного с существенным генетическим перепрограммированием и приспособлением, а скорее включает защитные механизмы хозяина для инициации системной устойчивости [73]. Потенциал сурфактина вызывать системную устойчивость растений был впервые показан на образцах фасоли и томата [42]. Применение липопептида в чистом виде в микромолярных концентрациях привело к значительному снижению заболеваемости растений, инфицированных *Botrytis cinerea*. Кавой с соавт. [66] было проведено исследование с большим количеством природных изолятов рода *Bacillus*, различающихся по способности продуцировать липопептиды в заданных условиях *in vitro*. Некоторые изоляты не продуцировали ни одного липопептида, другие продуцировали два или все три семейства липопептидов, включая итурины, фенгицины и сурфактины в разных пропорциях. Наблюдалась сильная корреляция между защитной активностью бактериальных экстрактов против *Botrytis cinerea* и количеством продуцируемого ими сурфактина.

Воздействием на растения в первые 15–20 сут онтогенеза или до посева путем обработки семян определенными биологически активными веществами, можно индуцировать изменение их метаболизма в сторону, неблагоприятную для патогенов [74]. Замачивание семян пастбищного райграсса в суспензии бактериальных клеток *B. amyloliquefaciens*, продуцирующих сурфактин, привело к активации индуцированной системной устойчивости растений против *Magnaporthe oryzae* [68].

Основой коммерческого препарата “Фитоспорин-М”, широко применяемого в России и содержащего бактерии *B. subtilis*, является штамм *B. subtilis* 26Д, продуцирующий сурфактин. В геноме штамма *B. subtilis* 26Д были обнаружены гены, кодирующие субъединицы сурфактинсинтетазы, при этом не было обнаружено генов, ответственных за синтез итуринсинтетазы, и фенгицинсинтетазы [71]. Авторы показали, что сурфактин из *B. subtilis* 26Д защищает растение от септориоза злаков, причем не только за счет прямого фунгицидного действия, но и опосредованно — через усиление экспрессии генов защитных белков растений и активации у растений-хозяев иммунного потенциала. Обработка корней пастбищного райграсса сурфактином и суспензией клеток *B. amyloliquefaciens* FZB42-АК3 (штамм продуцирует только сурфактин, но не противогрибковые соединения бацилломицин D и фенгицин) значительно снижало заболеваемость растений *M. oryzae* [68]. Показано, что сурфактин вызывает многоуровневую активацию ISR у райграсса за счет усиленного накопления перекиси водорода в корнях растений и протекания последующих H_2O_2 -опосредованных защитных реакций. Наблюдалось быстрое повышение активности пероксидазы в межклеточной жидкости обработанных растений.

Показано отложение каллозы и фенольных соединений на листовых пластинках райграсса в местах заражения *M. oryzae*. H_2O_2 -зависимая, опосредованная пероксидазой, взаимосвязь локализованных в клеточной стенке фенольных соединений играет значимую роль в укреплении клеточных стенок растений и ограничении проникновения патогенов. В работе Онгена с соавт. [42] инициация сурфактином ISR приводила к увеличению активности всех ферментов, разлагающих гидропероксиды. В работе Родригеса с соавт. [70] пероксидазная активность и отложение фенольных соединений под зоной грибковой инфекции были значительно выше у зараженных образцов арахиса, предварительно обработанных сурфактином, по сравнению с необработанными сурфактином образцами.

Точный механизм непосредственного действия сурфактина против бактериальных патогенов пока неизвестен. Опубликованные на настоящий день данные показывают, что ингибирующий эффект сурфактина не связан с его прямым воздействием на жизнеспособность клеток-мишеней, а обусловлен вмешательством в ключевые процессы развития патогена такие как образование биопленки *Pseudomonas syringae* [59] или развитие воздушных гиф, как показано для свободной почвенной бактерии *Streptomyces coelicolor* [75]. При этом сурфактин не ингибирует рост субстратных гиф *S. coelicolor*, что можно было бы ожидать, если бы он действовал как антибиотик.

Почти все антибиотики, повышающие устойчивость растения к патогенам, глубоко проникают в ткани растений, увеличивая риск пагубного влияния плодов этого растения на человека. Однако сурфактин не распространяется в тканях растений. В работе Онгена с соавт. [42] живые клетки изолята, принадлежащего роду *Bacillus*, не были обнаружены в образцах листьев фасоли и томата после обработки корневой системы бактериальной суспензией, что свидетельствует о том, что бактерии не мигрируют в межклеточное пространство растений. Таким образом, для сурфактина ингибирование развития фитопатогенов происходит за счет индукции резистентности в растении-хозяине, поскольку бациллы и патоген остаются локализованными на разных частях растения. При этом бактериальная популяция на корнях находится в пределах концентраций, необходимых для иницирования индуцированной системной устойчивости.

В последние годы исследования возможности применения в сельском хозяйстве аэробных эндоспорообразующих бактерий привели к разработке различных продуктов на основе штаммов рода *Bacillus* для коммерческого использования в качестве микробных пестицидов, фунгицидов или удобрений [72]. Бациллы способны образовывать споры, которые позволяют им противо-

стоять неблагоприятным условиям окружающей среды, их можно безопасно транспортировать, хранить и суспендировать в жидкости для удобства применения [76]. Несколько коммерческих продуктов на основе *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* и *B. subtilis* продаются как биофунгициды.

Согласно данным литературы, разные штаммы рода *Bacillus* продуцируют разные типы липопептидов, и как следствие, обладают разной активностью даже в отношении одного и того же возбудителя. Молекулярные и физиологические механизмы, с помощью которых бациллы проявляют биофунгицидную активность, во многих случаях полностью не изучены. Предполагается, что биорегулирующая активность бацилл является результатом согласованного действия их антибактериальной активности и колонизации растений. Исследования последних лет, обобщенные в настоящем обзоре, доказывают ключевую роль сурфактина в колонизации корней среди ассоциированных с растениями видов *Bacillus* spp., образовании биопленки, а также в качестве сигнальной молекулы во время формирования внеклеточного матрикса. Для широкого спектра растений-хозяев показано, что малые концентрации сурфактина являются пусковым сигналом к включению сложного каскада защитных механизмов индуцированной системы устойчивости к фитопатогенам. Учитывая, что такой механизм защиты растений является более благоприятным для окружающей среды, чем применение пестицидов, стоит рассмотреть использование сурфактина в сельском хозяйстве в качестве природного биопестицида и стимулятора роста растений. Все представленные в настоящем обзоре эксперименты по использованию сурфактина были выполнены в лабораторных условиях. В настоящее время речь не идет о широком применении сурфактина в сельском хозяйстве. Однако тот факт, что именно сурфактин является ведущим липопептидом среди липопептидов рода *Bacillus*, должен стимулировать исследователей к скринингу эффективных штаммов-продуцентов сурфактина среди бацилл, для выбора кандидатов для производства биопестицидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации “Анализ микробиомов растений и беспозвоночных животных экстремальных мест обитания с целью разработки штаммов-продуцентов новых метаболитов и ферментов” № 075-15-2021-1396 от 26 октября 2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fracchia L., Banat J.J., Cavallo M., Ceres C., Banat I.V. // AIMS Bioengineering. 2015. V. 2. № 3. P. 144–162. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.3.144>
2. Wu Y.S., Ngai S.C., Goh B.H., Chan K.G., Lee L.H., Chuah L.H. // Front Pharmacol. 2017. V. 8. Art. 76. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00761>
3. Arima K., Kakinuma A., Tamura G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1968. V. 31. P. 488–494. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
4. Lilge L., Ersig N., Hubel P., Aschern M., Pillai E., Klausmann P., Pfannstiel J., Henkel M., Heravi K.M., Hausmann R. // Microorganisms. 2022. V. 10. № 4. P. 779. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040779>
5. Bartal A., Vigneshwari A., Boka B., Voros M., Takacs I., Kredics L., Manczinger L., Varga M., Vágvolgyi C., Szekeres A. // Molecules. 2018. V. 23. № 10 Art. 2675. <https://doi.org/10.3390/molecules23102675>
6. Stein T. // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. № 4. P. 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
7. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
8. Hsieh F.C., Li M.C., Lin T.C., Kao S.S. // Curr. Microbiol. 2004. V. 49. P. 186–191. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4314-7>
9. Long X., He N., He Y., Jiang J., Wu T. // Bioresour. Technol. 2017. V. 241. P. 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.120>
10. Marcelino L., Puppini-Rontani J., Coutte F., Machini M.T., Etcheagaray A., Puppini-Rontani R.M. // Amino Acids. 2019. V. 51. P. 1233–1240. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02750-1>
11. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J., Marchant R. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. № 2. P. 427–444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
12. Varvaresou A., Iakovou K. // Lett. Appl. Microbiol. 2015. V. 61. № 3. P. 214–223. <https://doi.org/10.1111/lam.12440>
13. Kakinuma A., Hori M., Isono M., Tamura G., Arima K. // Agric. Biol. Chem. 1969. V. 33. P. 971–972. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859408>
14. Kakinuma A., Sugino H., Isono M., Tamura G., Arima K. // Biol. Chem. 1969. V. 33. P. 973–976. <https://doi.org/10.1080/00021369.1969.10859409>
15. Liu J.F., Mbadinga S.M., Yang S.Z., Gu J.D., Mu B.Z. // Int. J. Mol. Sci. 2015 V. 16. № 3. P. 4814–4837. <https://doi.org/10.3390/ijms16034814>
16. Liu J., Zou A., Mu B. // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2010. V. 361. P. 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.03.021>
17. Vass E., Besson F., Majer Z., Volpon L., Hollosi M. // Biochem. Biophys. Res Commun. 2001. V. 282. № 1. P. 361–367. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4469>
18. Bonmatin J.-M., Laprevote O., Peypoux F. // Comb. Chem. High Throughput Screen. 2003. V. 6. № 6. P. 541–556. <https://doi.org/10.2174/138620703106298716>
19. Aleti G., Sessitsch A., Brader G. // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2015. V. 13. P. 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>

20. *Kecskemeti A., Bartal A., Boka B., Kredics L., Manczinger L., Shine K., Alharby N.S., Khaled J.M., Varga M., Vagvolgyi C., Szekeres A.* // *Molecules*. 2018. V. 23. Art. 2224. <https://doi.org/10.3390/molecules23092224>
21. *Aleti G., Lehner S., Bacher M., Compant S., Nikolic B., Plesko M., Schuhmacher R., Sessitsch A., Brader G.* // *Environ. Microbiol.* 2016. V. 18. № 8. P. 2634–2645. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13405>
22. *Liu J.F., Yang J., Yang S.Z., Ye R.Q., Mu B.Z.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 166. № 8. P. 2091–2100. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9636-5>
23. *Liu X., Tao X., Zou A., Yang S., Zhang L., Mu B.* // *Protein Cell*. 2010. V. 1. № 6. P. 584–594. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0072-4>
24. *Kracht M., Rokos H., Ozel M., Kowall M., Pauli G., Vater J.* // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1999. V. 52. № 7. P. 613–619. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.613>
25. *Eeman M., Berquand A., Dufrene Y.F., Paquot M., Dufour S., Deleu M.* // *Langmuir*. 2006. V. 22. № 26. P. 11337–11345.
26. *Liu X., Yang S., Mu B.* // *Process Biochemistry*. 2009. V. 44. № 1. P. 1144–1151. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.06.014>
27. *Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1488. № 3. P. 211–218. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)
28. *Dufour S., Deleu M., Nott K., Wathélet B., Thonart P., Paquot M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1726. № 1. P. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.06.015>
29. *Jiang J., Gao L., Bie X., Lu Z., Liu H., Zhang C., Lu F., Zhao H.* // *BMC Microbiol.* 2016. V. 16. Art. 31. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0645-3>
30. *Medema M.H., Kottmann R., Yilmaz P., Cummings M., Biggins J.B., Blin K., de Bruijn I., Chooi Y.H., Claessen J., Coates R.C.* // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. P. 625–631. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>
31. *Theatre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Leonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H., Jacques P.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. Art. 623701. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701>
32. *Koumoutsi A., Chen X.H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 4. P. 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
33. *Willenbacher J., Mohr T., Henkel M., Gebhard S., Mascher T., Syldatk C., Hausmann R.* // *J. Biotechnol.* 2016. V. 224. P. 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.002>
34. *Jiao S., Li X., Yu H., Yang H., Li X., Shen Z.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2017. V. 114. P. 832–842. <https://doi.org/10.1002/bit.26197>
35. *Quadri L.E., Weinreb P.H., Lei M., Nakano M.M., Zuber P., Walsh C.T.* // *Biochemistry*. 1998. V. 37. № 6. P. 1585–1595. <https://doi.org/10.1021/bi9719861>
36. *Nakano M.M., Corbell N., Besson J., Zuber P.* // *MGG Mol. Gen. Genet.* 1992. V. 232. P. 313–321. <https://doi.org/10.1007/BF0028001>
37. *Li X., Yang H., Zhang D., Li X., Yu H., Shen Z.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 42. P. 93–103. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1527-z>
38. *Rahman F.B., Sarkar B., Moni R., Rahman M.S.* // *Biotechnol. Rep.* 2021. V. 32. P. e00686. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00686>
39. *Seydlova G., Svobodova J.* // *Cent. Eur. J. Med.* 2008. V. 3. P. 123–133. <https://doi.org/10.2478/s11536-008-0002-5>
40. *Ishigami Y., Osman M., Nakahara H., Sano Y., Ishiguro R., Matsumoto M.* // *Colloids Surf. B*. 1995. V. 4. P. 341–348.
41. *Chen B., Wen J., Zhao X., Ding J., Qi G.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. Art. 631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00631>
42. *Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J.L., Thonart P.* // *Environ Microbiol.* 2007. V. 9. № 4. P. 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
43. *Deleu M., Lorent J., Lins L., Brasseur R., Braun N., El Kirat K., Nylander T., Dufrene Y.F., Mingeot-Leclercq M.P.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1828. № 2. P. 801–815. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.007>
44. *Li T., Li L., Du F., Sun L., Shi J., Long M., Chen Z.* // *Molecules*. 2021. V. 26. № 11. Art. 3438. <https://doi.org/10.3390/molecules26113438>
45. *Tran C., Cock I.E., Chen X., Feng Y.* // *Antibiotics (Basel)*. 2022. V. 11. № 1. Art. 88. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010088>
46. *Maget-Dana R., Ptak M.* // *Biophys. J.* 1995. V. 68. P. 1937–1943. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80370-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80370-X)
47. *Maget-Dana R., Ptak M.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1992. V. 153. P. 285–291. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90319-H](https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90319-H)
48. *Liu J., Li W., Zhu X., Zhao H., Lu Y., Zhang C., Lu Z.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 11. P. 4565–4574. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09808-w>
49. *Stoll A., Salvatierra-Martínez R., Gonzalez M., Araya M.* // *Microorganisms*. 2021. V. 9. № 11. Art. 2251. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112251>
50. *Marahiel M.A., Nakano M.M., Zuber P.* // *Mol. Microbiol.* 1993. V. 7. № 5. P. 631–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01154.x>
51. *Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 6. P. 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
52. *Sachdev D.P., Cameotra S.S.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>
53. *Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X., Borriss R.* // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
54. *Hofemeister J., Conrad B., Adler B., Hofemeister B., Feesche J., Kucheryava N., Steinborn G., Franke P., Grammel N., Zwintscher A., Leenders F., Hitzeroth G., Vater J.* // *Mol. Genet. Genomics*. 2004. V. 272. № 4. P. 363–378. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1056-y>

55. Morikawa M. // J. Biosci Bioeng. 2006. V. 101. № 1. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1263/jbb.101>
56. Therien M., Kiesewalter H.T., Auria E., Charron-Lamoureux V., Wibowo M., Maroti G., Kovacs A.T., Beauregard P.B. // Biofilm. 2020. V. 2. Art. 100021.
<https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100021>
57. Asaka O., Shoda M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 11. P. 4081–4085.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4081-4085.1996>
58. Toure Y., Ongena M., Jacques P., Guirio A., Thonart P. // J. Appl. Microbiol. 2004. V. 96. № 5. P. 1151–1160.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
59. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 1. P. 307–319.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
60. Zerrouh H., de Vicente A., Perez-García A., Romero D. // Environ. Microbiol. 2014. V. 16. № 7. P. 2196–2211.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12271>
61. Luo C., Zhou H., Zou J., Wang X., Zhang R., Xiang Y., Chen Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. № 4. P. 1897–1910.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6195-4>
62. Fan H., Zhang Z., Li Y., Zhang X., Duan Y., Wang Q. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1973.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>
63. Nifakos K., Tsalgaidou P.C., Thomludi E.E., Skagia A., Kotopoulis D., Baira E., Delis C., Papadimitriou K., Markellou E., Venieraki A., Katinakis P. // Plants (Basel). 2021. V. 10. № 8. Art. 1716.
<https://doi.org/10.3390/plants10081716>
64. García-Gutiérrez L., Zerrouh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Perez-García A. // Microb. Biotechnol. 2013. V. 6. № 3. P. 264–274.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>
65. Desoignes N., Schramme F., Ongena M., Legréve A. // Mol. Plant Pathol. 2013. V. 14. № 4. P. 416–421.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12008>
66. Cawoy H., Mariutto M., Henry G., Fisher C., Vasilyeva N., Thonart P., Dommes J., Ongena M. // Mol. Plant Microbe Interact. 2014. V. 27. № 2. P. 87–100.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
67. Waewthongrak W., Leelasuphakul W., McCollum G. // PLoS One. 2014. V. 9. № 10. Art. e109386.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109386>
68. Rahman A., Uddin W., Wenner N.G. // Mol. Plant Pathol. 2015. V. 16. № 6. P. 546–558.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12209>
69. Yamamoto S., Shiraishi S., Suzuki S. // Lett. Appl. Microbiol. 2015. V. 60. № 4. P. 379–386.
<https://doi.org/10.1111/lam.12382>
70. Rodriguez J., Tonelli M.L., Figueredo M.S., Ibanez F., Far A. // Eur. J. Plant Pathol. 2018. V. 152. P. 845–851.
<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1524-6>
71. Черепанова Е.А., Благова Д.К., Бурханова Г.Ф., Сарварова Е.С., Максимов И.В. // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 339–346.
<https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346>
72. Li Y., Heloir M.C., Zhang X., Geissler M., Trouvelot S., Jacquens L., Henkel M., Su X., Fang X., Wang Q., Adrian M. // Mol. Plant Pathol. 2019. V. 20. № 8. P. 1037–1050.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12809>
73. Debois D., Fernandez O., Franzil L., Jourdan E., de Brogniez A., Willems L., Clément C., Dorey S., De Pauw E., Ongena M. // Environ. Microbiol. Rep. 2015. V. 7. № 3. P. 570–582.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12286>
74. Поликсенова В.Д. // Вестник БГУ. Сер. 2. 2009. № 1. С. 48–60.
75. Straight P.D., Willey J.M., Kolter R. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 13. P. 4918–4925.
<https://doi.org/10.1128/JB.00162-06>
76. Pérez-García A., Romero D., de Vicente A. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 2. P. 187–193.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>

SURFACTIN: BIOLOGICAL ACTIVITY AND THE POSSIBILITY OF AGRICULTURE APPLICATION (REVIEW)

O. V. Kisil^{a,*}, V. S. Trefilov^b, V. S. Sadykova^a, M. E. Zvereva^b, and E. A. Kubareva^c

^a Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

^b Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^c Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: olvv@mail.ru

Relevant information about surfactin, a cyclic lipopeptide which is one of the strongest bacterial biosurfactants, is summarized in the review. Mechanisms of surfactin biosynthesis and spectrum of surfactin's native and synthetic isoforms are demonstrated. Surfactin biological activity and its role in regulation of the all processes of strain-producers are analyzed. The application potential of surfactin and its biological derivatives, which were obtained with the usage of surfactin producing strains of the genus *Bacillus*, for plants protection and stimulation of plant immunity is pointed out.

Keywords: surfactin, *Bacillus* spp., plants protection

УДК 57.02:579.6

МЕХАНИЗМЫ РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕГО И ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНДОФИТНЫХ PGP-БАКТЕРИЙ В РАСТЕНИЯХ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗАСУХИ (ОБЗОР)

© 2023 г. О. В. Ласточкина¹ *, Ч. Р. Аллагулова¹

¹ Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: oksana.lastochkina@ufaras.ru

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Обзор посвящен анализу и систематизации современных данных об участии эндофитных ростстимулирующих (PGP)-бактерий в регуляции роста, развития, формировании урожая и стрессоустойчивости культурных растений, главным образом яровой пшеницы, являющейся ведущей в мире хлебной культурой. Описаны сведения о взаимодействии растений с PGP-бактериями в норме и при воздействии засухи. Особое внимание уделено молекулярным механизмам регуляции PGP-бактериями растительного метаболизма в норме, а также их роли в снижении негативных последствий засухи, достигаемом путем модуляции в растениях различных процессов, в частности водного обмена, минерального питания, активации антиоксидантной и осмопротекторной систем. При этом важную роль играет способность PGP-бактерий продуцировать различные метаболиты, обладающие свойствами биологически активных веществ, например, веществ с антимикробной и гормональной активностью, ферментов и других соединений. Приведены сведения об эндофитном микробиоме пшеницы, выяснение функциональной активности которого необходимо для разработки эффективных и безопасных стратегий практического применения эндофитов с целью максимальной реализации адаптационного и продуктивного потенциала пшеницы в меняющихся условиях среды.

Ключевые слова: эндофитные PGP-бактерии, биопраймирование семян, растительно-микробные взаимодействия, пшеница, засухоустойчивость

DOI: 10.31857/S0555109923010038, **EDN:** CUREEM

В связи с глобальными климатическими изменениями возрастает частота возникновения неблагоприятных природных явлений, среди которых засуха принадлежит к числу наиболее широко распространенных и непредсказуемых внешних факторов [1, 2]. Ее воздействие негативно отражается на всех звеньях растительного метаболизма, включая фотосинтез, дыхание, биосинтез белка, что приводит к торможению роста, развития и снижению продуктивности культурных растений [1–4]. По оценкам ФАО (FAO, Food and Agriculture Organization United Nations) потери урожая, вызываемые засухой, могут составлять свыше 50 и достигать 80%, что представляет серьезную проблему для мировой продовольственной безопасности [1, 2]. Для удовлетворения потребностей растущего населения планеты, численность которого к 2050 г. должна превысить 9 млрд человек, производство продуктов питания необходимо увеличить на 70%, а в развивающихся странах вдвое, преимущественно за счет повышения эффектив-

ности возделывания зерновых культур [5, 6]. Главной продовольственной культурой, на долю которой приходится более трети всех пахотных площадей и составляющей более 50% рациона человека является пшеница, потребление которой в 2019 г. составляло 98.7 кг в год на человека [7].

Пшеница представляет собой растение с однолетним циклом и являющееся озимым или яровым злаком [1, 5, 8–10]. На практике при возделывании культур, предусматривается применение различных удобрений и ряда химических препаратов, в частности фунгицидов и гербицидов, использование которых представляет серьезную угрозу для окружающей среды и здоровья человека. В этой связи возрастает актуальность поиска эффективных и экологически безопасных путей повышения урожайности культурных растений и снижения уровня негативного воздействия на них стрессовых факторов окружающей среды путем индукции естественных защитных механизмов растений [1, 5, 8–10].

В современном растениеводстве все более широкое распространение приобретает стратегия праймирования, которая заключается в повышении природной сопротивляемости растений под влиянием различных индуцирующих агентов [11–14]. При праймировании активация защитных программ происходит при воздействии на растения мягких внешних стимулов и сигналов, способствующих предварительной настройке растительного метаболизма к возможным в последующем неблагоприятным ситуациям [12, 15]. В качестве праймирующих агентов могут быть использованы слабые кратковременные стрессовые обработки, различные биологически активные соединения, сигнальные молекулы или микроорганизмы [12]. Опосредованная праймингом защита может быть длительной, поддерживаться на протяжении всего жизненного цикла растений и даже передаваться следующему поколению. Одной из наиболее перспективных на сегодняшний день представляется технология биопраймирования, основанная на применении полезных микроорганизмов, в частности стимулирующих рост растений бактерий, обозначаемых в литературе как **PGP-бактерии** (PGPB – plant growth-promoting bacteria) [14, 16]. Праймирование (предпосевная обработка) PGP-бактериями улучшает урожай и рост растений, не оказывая негативного влияния на их развитие и морфологию [15]. В растениях, предобработанных PGP-бактериями, как правило, значимых изменений в экспрессионной активности защитных генов не выявляется, однако в случае какой-либо патогенной атаки или абиотического стресса предобработанные растения отличаются от необработанных более быстрым и сильным ответом [15, 17–19]. PGP-бактерии оказывают положительное влияние на растительный организм за счет собственного синтеза различных биологически активных веществ, содействуя максимальной реализации потенциала культурных растений, являясь при этом дружественными окружающей среде [6, 16, 20, 21]. В последние годы наблюдается лавинообразный рост числа работ, свидетельствующих о повышении под влиянием PGP-бактерий устойчивости культурных растений, в том числе и пшеницы, к различным стрессовым факторам биотического [22–25] и абиотического происхождения [26–31], включая засуху [16, 21, 32–36].

Ассоциированная с растениями микробиота включает 3 группы: (1) эпифитная – микробиота, обитающая на поверхности наземных частей растений; (2) ризосферная – почвенная микробиота, обитающая у корней; (3) эндофитная – микробиота, колонизирующая внутренние ткани растений [37]. В зависимости от типа воздействия на рост растений различают полезные, вредные и нейтральные бактерии. Среди ассоциированных со злаковыми культурами PGP-бактерий, идентифицированы виды, принадлежащие к таким

родам как *Bacillus*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Citricoccus*, *Lysinibacillus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas* и т.д. [31, 35, 38, 39]. Особым преимуществом отличаются полезные эндофитные PGP-бактерии или эндобактерии, жизнедеятельность которых бессимптомно протекает внутри растительного организма, оказывающих положительное влияние на растительный метаболизм изнутри, обеспечивая защиту растения-хозяина от неблагоприятных внешних условий [20, 37, 40]. Кроме того, внедрившись однажды в растительный организм, эндобактерии способствуют формированию долговременной защиты растений, как в ходе всего онтогенеза, так и в послеуборочный период при хранении продукции [16, 33, 36, 41–44]. Эндофитные микроорганизмы распространены среди растительных организмов повсеместно и обнаруживаются в разных частях растений [20, 40, 45, 46]. Рост эндофитов в растительных тканях находится под контролем своего хозяина. Поддержание стабильного симбиоза с растениями достигается благодаря микробной продукции различных соединений, способствующих росту растений и их адаптации к внешним условиям [15]. Вместе с тем многие аспекты взаимодействия эндофитных PGP-бактерий с растениями пшеницы при воздействии засухи недостаточно ясны и требуют дальнейшего детального изучения. Следует также обратить внимание на то, что эффективность определенного штамма PGP-бактерий в отношении одного и того же растительного вида может варьировать в зависимости от способа обработки, генотипа растения, географии произрастания, вида стресса и других факторов [46, 48–50].

В данном обзоре проведены анализ и систематизация современных данных о вовлечении эндофитных PGP-бактерий в регуляцию ростовых процессов, формирование урожая и развитие защитных реакций культурных растений. Особое внимание уделено взаимодействию эндофитов с растениями пшеницы, описаны множественные физиолого-биохимические и молекулярные механизмы, лежащие в основе проявления PGP-бактериями ростстимулирующего и защитного эффектов на растения пшеницы в норме и при воздействии засухи. Представлены имеющиеся сведения об эндофитном микробиоме пшеницы, выяснение роли и функций которых может иметь принципиально важное значение для разработки эффективных технологий их практического применения для повышения продуктивности пшеницы в долгосрочной перспективе с сохранением окружающей среды.

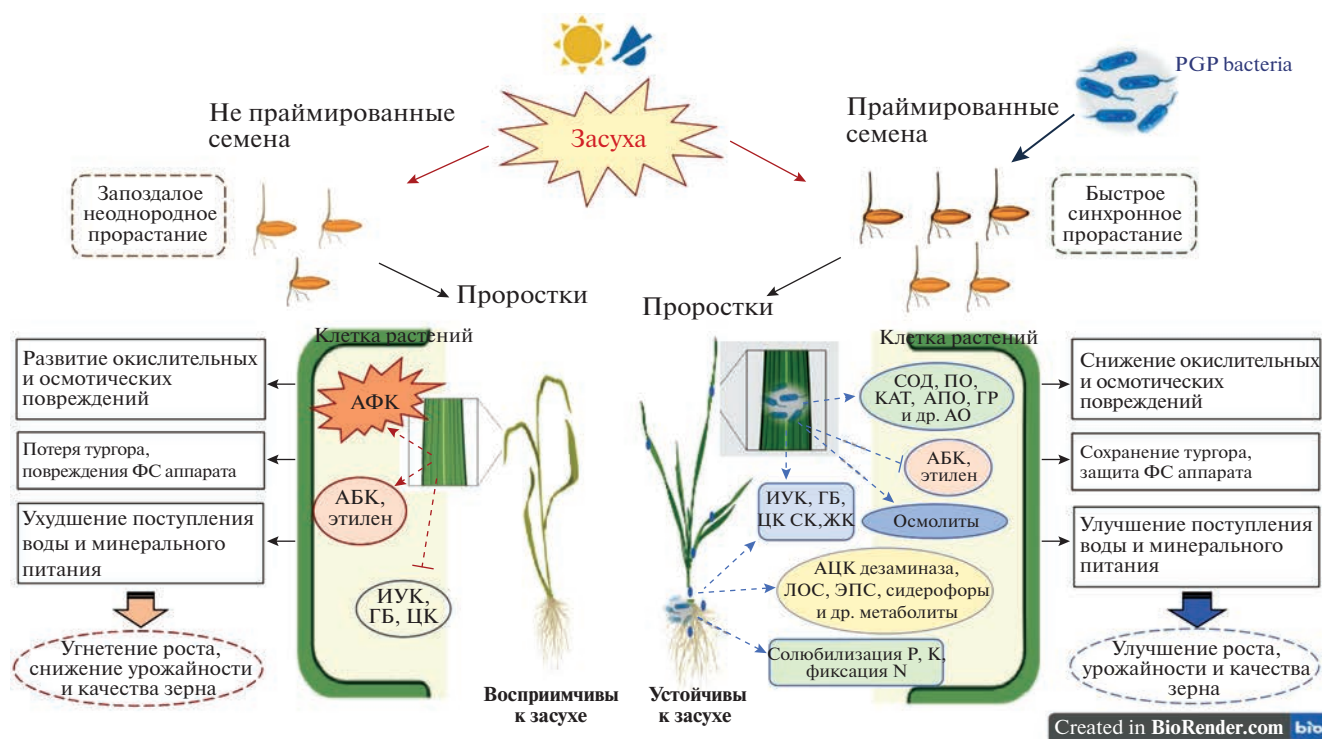


Рис. 1. Основные механизмы ростстимулирующего и антистрессового действия эндофитных PGP-бактерий на растения пшеницы в условиях засухи. АБК — абсцизовая кислота; АО — антиоксиданты; АПО — аскорбатпероксидаза; АФК — активные формы кислорода; АЦК дезаминаза — 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-дезаминаза; ГБ — гиббереллины; ГР — глутатион редуктаза; ЖК — жасмоновая кислота; ИУК — индолил-3-уксусная кислота; КАТ — каталаза; ЛОС — летучие органические соединения; ПО — пероксидаза; СК — салициловая кислота; СОД — супероксиддисмутаза; ЦК — цитокинины; ЭПС — экзополисахариды; Р — фосфор; К — калий; N — азот.

МЕХАНИЗМЫ РЕАЛИЗАЦИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ PGP-БАКТЕРИЙ НА РАСТЕНИЯ

Имеющиеся в литературе данные позволяют утверждать, что в основе физиологического действия полезных микроорганизмов на растения лежат множественные механизмы, которые можно отнести к двум группам: прямые и косвенные [43]. При этом обе группы механизмов обуславливаются способностью PGP-бактерий продуцировать широкий спектр биологически активных веществ, например соединений с антимикробной активностью, гормонов (ауксины, цитокинины (ЦК), гиббереллины (ГБ), абсцизовая кислота (АБК), салициловая кислота (СК), жасмонаты, этилен), различных ферментов, в частности 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазу, летучих органических соединений (ЛОС), экзополисахаридов (ЭПС), биосурфактантов, сидерофоров и др. Прямые механизмы модуляции метаболизма растений могут осуществляться за счет регуляции в них эндогенного уровня фитогормонов и повышения доступности элементов минерального питания при участии PGP-бактерий в процессах азотфиксации, солубилизации фосфатов, секвестрации железа [30, 51–53]. Непрямые меха-

низмы связаны с индуцированием в растениях системных защитных реакций при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды [43]. Тесное функциональное взаимодействие разнообразных прямых и непрямых механизмов влияния PGP-бактерий на растения в совокупности способствует стимуляции роста в нормальных условиях произрастания и развитию их устойчивости при неблагоприятных внешних воздействиях, вызывающих дефицит влаги (рис. 1).

Улучшение минерального питания растений. Одним из свойств эндофитных PGP-бактерий, обуславливающим их способность оказывать положительное влияние на рост и развитие растений в норме и при стрессе, является их способность повышать доступность элементов минерального питания, т.е. функционировать в качестве биоудобрений [24, 53, 54] (рис. 1). К числу основных элементов питания растений принадлежит азот (N), который по количественному содержанию в клетке занимает четвертое место (после углерода, водорода и кислорода) и является обязательным компонентом азотистых оснований, нуклеиновых кислот и белков. Дефицит N легко распознается на злаковых культурах характерным осветлением всего растения и побурением сначала нижних листьев, а

затем листьев в средней части растения, которые впоследствии засыхают. В таком состоянии замедляется протекание процессов, формирующих будущий урожай. Так, если недостаток N проявился в фазе кущения, прекращается образование продуктивных побегов, если в фазе трубки — в растениях наблюдается торможение процесса закладки дополнительных “этажей” в колосе, то есть дефицит N в фазе флагового листа приводит к тому, что не образуются дополнительные цветки, а во время колошения — зерновки. А если азотное голодание наступает во время налива зерна, то зерновки будут шуплыми, невыполненными и плохого качества [55].

Ассимиляция N в растениях пшеницы осуществляется главным образом за счет активности корней. При этом в цитозоле нитрат редуцируются до нитрита под действием НАДФН-зависимой нитратредуктазы (НАДФН-НР). На сегодняшний день в гексаплоидной пшенице идентифицированы два гена, кодирующих фермент НАДФН-НР. Поскольку нитриты характеризуются высокой реакционной способностью и могут оказывать токсическое действие на клетку, происходит их быстрая транспортировка из цитозоля в хлоропласты и пластиды, где под действием нитритредуктазы происходит превращение нитрита в ионы аммония (NH_4^{+}). Затем аммоний ассимилируется с образованием глутаминовой аминокислоты и глутамата, которые служат источником азота при синтезе других азотсодержащих соединений: аминокислот, азотистых оснований, РНК, ДНК [56]. Активно обсуждается роль PGP-бактерий в процессах ассоциативной азотфиксации, способствующей интенсификации роста растений, включая пшеницу. Помимо ризобияльных микроорганизмов (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*), для которых широко известно образование симбиозов с бобовыми растениями и участие в азотфиксации последних, выявлены представители эндофитных PGP-бактерий, как например, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Azospirillum*, способных к фиксации атмосферного азота (N_2), а также усвоению его органических и минеральных соединений из почв, повышающих его доступность для растений пшеницы [10, 56, 57]. Было показано, что инокуляция растений пшеницы *B. subtilis* 2 способствовала усвоению азота, вносимого с минеральными удобрениями и уменьшению соответственно доз вносимых удобрений. При этом эти бактерии не только принимали участие в процессах трансформации азота (денитрификации и аммонификации), но и стимулировали деятельность других ризосферных азотфиксаторов [58].

Сообщается, что за счет обработки *Azotobacter brasilense* можно уменьшить дозу внесения азотных удобрений на 30–40 кг/га [53, 59, 60]. Например, *A. brasilense* обеспечило большее накопление

азота (+35.5 кг/га) и микроэлементов (B, Fe, Mn, Cu) в надземной части пшеницы по сравнению с инокулированными растениями [53], вероятно, за счет улучшения развития корневой системы, которая позволяет охватить больший объем почвы и способствует более активному усвоению питательных веществ [10, 61, 62]. В более ранних работах также сообщалось о синергическом эффекте между *A. brasilense* и увеличением эффективности абсорбции питательных веществ (N, P и K) в растениях пшеницы [63]. Галиндо с соавт. [61] также наблюдали, что *A. brasilense* AbV5 и AbV6 увеличивали концентрации N, Ca, Mg, Mn и Zn в зернах пшеницы.

Фосфор (P) является основным, после азота, питательным элементом, лимитирующим рост, и в отличие от него, не имеет атмосферного биологически доступного источника. В сельскохозяйственной практике традиционно для улучшения фосфорного питания культурных растений регулярно используются минеральные удобрения, большая часть которых после внесения в почву быстро превращается в нерастворимую форму и доступность его для растений резко снижается [55]. Это требует внесения новых фосфорных удобрений и, таким образом, происходит накопление в почве больших количеств нерастворимых и не усвояемых растениями соединений фосфора, что приводит к “зафосфачиванию” почв. В повышении доступности этого элемента для растений большую роль играют микроорганизмы, способные растворять нерастворимые в воде и недоступные растениям формы почвенных соединений фосфора за счет продуцирования фосфатаз, органических кислот, сидерофоров, солибилизирующих фосфаты и способствующих их усвоению растениями. P-солибилизирующая активность продемонстрирована для представителей родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Azospirillum* [63–65].

Следующим по значимости после фосфора питательным элементом является калий (K), играющий незаменимую роль в метаболизме растений. Он необходим для нормального функционирования около сотни, ответственных за нормальное протекание различных процессов, например, таких как энергетический метаболизм, синтез крахмала, восстановление нитратов, фотосинтез и деградация сахара. Почвенный K в форме калий-алюмосиликатов, составляющий 98–99% от его общего содержания, труднодоступен для питания растений, однако его доступность может быть существенно повышена за счет микробной мобилизации. Так как использование калийных удобрений оказывает вредное воздействие на окружающую среду, необходимо найти альтернативный источник для поддержания его уровня в почвах для устойчивого производства сельскохозяйственных культур [55, 66]. К настоящему времени накопились данные, свидетельствующие о способности

PGP-бактерий наряду с азотом и фосфором также повышать и содержание калия в растениях пшеницы [63]. Чандра с соавт. [67] показали, что такие виды бактерий, как *Variovorax paradoxus* RAA3, *Pseudomonas* sp. UW4, *P. palleroniana* DPB16 способны увеличивать содержание N, P, K, Ca^{2+} и Na^+ как в зерне пшеницы, так и в соломе.

Положительное влияние на минеральное питание и рост растений могут оказывать продуцируемые PGP-бактериями биосурфактанты — липопептидные вещества, обладающие поверхностно-активными свойствами, способными снижать коэффициент межфазного натяжения и эмульгировать труднорастворимые гидрофобные соединения, повышая их биодоступность для растений. Образование биосурфактантов выявлено для представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus* [24]. Биосурфактанты PGP-бактерий могут воздействовать на патогены, изменяя проницаемость их клеточных мембран, вызывая лизис клеток и продукцию сидерофоров, которые могут ограничивать рост патогенов [68]. Сидерофоры, переводя железо (Fe) в доступную для клеток форму, могут повышать его биодоступность для растений и способствовать его усвоению. Таким образом, сидерофоры могут вносить свой вклад в проявление ростстимулирующего и защитного действия PGP-бактерий. На сегодняшний день получены сведения о стимуляции роста многих видов растений под действием сидерофоров разного типа и их практическом применении с целью повышения урожайности сельскохозяйственных культур [69–71]. В частности, ростстимулирующее действие на растения было показано для псевдобактерина — сидерофора, очищенного из штамма *P. putida* [70, 71].

Применение эндофитных PGP-бактерий в качестве биоудобрений рассматривается как метод, альтернативный химическим удобрениям, наносящим серьезный ущерб не только растительным организмам, но всей биосфере в целом. Эндофитные PGP-бактерии можно использовать для праймирования семян и внесения в почву для получения более высокого урожая и улучшения здоровья почвы с помощью достаточного количества питательных веществ и ценной микрофлоры, поддерживая тем самым устойчивость агроэкосистем.

Продукция фитогормонов и регуляция их уровня в растениях. Ключевая роль в регуляции растительного онтогенеза и формировании устойчивости растений к стрессовым факторам среды принадлежит гормональной системе [3, 72]. Поэтому неудивительно, что ростстимулирующее и защитное действие эндофитных PGP-бактерий связывают с их способностью оказывать влияние на содержание фитогормонов в растениях и самим синтезировать вещества с гормональной активностью. Таким образом, в этом случае имеет место сложное взаимодействие гормональных систем двух партне-

ров, определяющее характер изменений в жизненной активности растений под влиянием эндофитов. Помимо пяти основных классов фитогормонов, к числу которых относят ауксины, ЦК, ГБ, этилен и АБК, гормональная активность была четко продемонстрирована для брассиностероидов (БС), СК, жасмонатов и стриголактонов. Если ауксины, ЦК, ГБ, БС и стриголактоны рассматриваются в качестве признанных активаторов метаболических процессов, то АБК, этилен, жасмонат и СК чаще относятся к индукторам стрессовых ответов в растениях. Следует отметить, что различные процессы растительного онтогенеза контролируются не каким-то отдельным гормоном, а определенным соотношением фитогормонов, функционирующих в тесном взаимодействии в единой гормональной системе. Различные представители PGP-бактерий, в том числе эндофиты, принадлежащие к таким родам как *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и др., способны синтезировать гормональные соединения, такие как ауксины, ЦК, ГБ, АБК, ЖК, СК и этилен [29, 57, 73–75].

Ауксины. Среди эндофитных PGP-бактерий широко распространена способность к синтезу ауксинов, контролирующих развитие сосудистых тканей, растяжение клеток и апикальное доминирование в растениях. К природным ауксинам принадлежит индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и к сегодняшнему дню хорошо изучен ее бактериальный синтез. Выявлены биохимические пути и гены, контролирующие синтез ИУК бактериями. PGP-бактерии влияют на экспрессию генов, белковые продукты которых принимают участие в реакциях биосинтеза ауксина, передачи сигналов или его транспортировки. *Phyllobacterium brassicae* STM196 и *Bacillus* sp. LZR216 повышали эндогенный уровень ИУК за счет индукции экспрессии генов синтеза ИУК [76]. Установлено, что для образования ИУК некоторыми PGP-бактериями необходимо присутствие в корневых выделениях ее метаболического предшественника L-триптофана. Обработка *Burkholderia phytofirmans* PsJN *Arabidopsis thaliana* увеличивала экспрессию генов, вовлеченных в биосинтез триптофана, и способствовала тем самым повышению уровня накопления ауксина. PGP-бактерии влияют на транспорт ауксина, изменяя активность и содержание переносчиков, участвующих в процессах оттока и притока ауксина. Так, штамм *Bacillus* sp. LZR216 снижал синтез транспортеров ауксина AUX1 и PIN1,2,3 [77], тогда как штамм *B. phytofirmans* PsJN, напротив, усиливал экспрессию PIN2 и PIN3 [78]. Получены данные о благоприятном действии ИУК, синтезируемой эндофитными PGP-бактериями, на корневую систему своих растений-хозяев стимулирующем инициацию, удлинение и ветвление корней, что в целом может способствовать улучшению потребления микро- и макроэлементов, ускорению роста рас-

тений и формированию устойчивости к неблагоприятным факторам среды [38, 79]. Инокуляция растений пшеницы синтезирующими ИУК PGP-бактериями стимулировала процессы образования и роста корней, с чем может быть связано усиление их поглотительной способности и повышение уровня поступления воды и питательных веществ в эти растения в условиях водного стресса [26, 80]. *Streptomyces*, продуцирующие ИУК также улучшали параметры роста и развития пшеницы в условиях нарушения водного режима [69]. Штамм *A. brasilense* Sp245 способствовал повышению качества зерна пшеницы, усвоению элементов минерального питания (K, Ca, Mg), поддержанию водного потенциала, абсолютного и относительного содержания воды (ОСВ) в тканях, а также сохранению эластичности клеточной стенки, что в совокупности оказывало положительное влияние на развитие засухоустойчивости растений пшеницы [81]. Продуцирующий ИУК штамм *Azospirillum* снижал степень негативного действия засоления на растения пшеницы, о чем можно было судить по улучшению различных продукционных параметров, включая биомассу, содержание хлорофилла и концентрацию питательных микроэлементов [82]. Имеются данные о снижении азоспириллами водного потенциала листьев и одновременном повышении в них содержания воды, что является следствием способности этих бактерий продуцировать ИУК, индуцировать формирование и рост латеральных корней растений пшеницы и повышать, таким образом, уровень поглощения воды и элементов питания в условиях засухи [32]. Важно отметить, что PGP-бактерии продуцируют ауксины в оптимальной для стимуляции роста корней концентрации, поскольку высокие концентрации ауксинов характерны для бактерий, вызывающих торможение роста корней [74]. Кроме того, PGP-бактерии могут влиять на гомеостаз ауксина посредством различных штамм-зависимых механизмов. Понимание характеристик каждого штамма PGP-бактерий является ключом к его продуктивному использованию в сельском хозяйстве [83].

Цитокинины (ЦК). Присутствие ЦК ранее было выявлено в фильтрате культур ряда бактерий, включая *Azotobacter* sp., *Arthrobacter*, *Rhizobium* spp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* [84]. Вместе с тем, несмотря на то, что для перечисленных бактерий была зарегистрирована эндофитная активность, в литературе недостаточно сведений об ускорении ростовых процессов в растениях под влиянием продуцируемых бактериями ЦК. Тем не менее, имеются данные об активации ростовых процессов растений пшеницы и стимуляции накопления биомассы при их инокуляции продуцирующими ЦК бактериями [74]. В частности, введение в прикорневую среду про-

ростков пшеницы *B. subtilis* IB-22 приводило к значительному увеличению содержания эндогенных ЦК в побегах проростков и сопровождалось повышением скорости роста листьев и накоплением сырой и сухой массы побегов [85]. Был сконструирован штамм *Sinorhizobium meliloti* с избыточной продукцией ЦК путем экспрессии гена *ipt* *Agrobacterium*, находящегося под контролем промотора *trp* *E. coli* [86]. После воздействия сильной засухи, растения люцерны инокулированные сконструированным штаммом *S. meliloti* отличались более крупными размерами по сравнению с образцами, инокулированными исходным штаммом. Несмотря на относительно невысокую распространенность продуцирующих ЦК эндофитных бактерий, приведенные выше данные могут указывать на их участие в формировании устойчивости растений к дефициту влаги.

Гиббереллины (ГБ). Стимулирующая рост растений активность эндофитных PGP-бактерий может обуславливаться их способностью синтезировать гормоны, принадлежащие к классу ГБ [74]. Например, для эндофитных бактерий *B. subtilis* 11BM оказывающих стимулирующий рост эффект на растения пшеницы, выявлена ГБ-подобная активность [87]. Штамм PGP-бактерии *Burkholderia phytofirmans* PsJN не влиял напрямую на синтез ГБ, но стимулировал экспрессию гена *AtGA3ox1*, кодирующего фермент, катализирующий финальные реакции образования ГБ у *A. thaliana* [88]. Полный путь бактериального биосинтеза ГБ был описан лишь относительно недавно [89].

Сообщалось о продукции физиологически активных форм ГБ GA1 и GA3 (GA, Gibberellic Acid), а также ИУК эндофитными бактериями *Acetobacter diazotrophicus* и *Herbaspirillum seropedicae*, которые формировали эффективное взаимодействие со злаковыми культурами и способствовали улучшению роста и общей урожайности [90]. В ходе культивирования бактерий *Rhizobium phaseoli* дикого типа или мутантных *nod*- и *fix*-штаммов проводился анализ продукции ими ГБ и ИУК сочетанием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и иммуноанализа [91]. Наличие молекул, подобных GA1, GA4, GA9 и GA20 было подтверждено с помощью хроматографического подхода и масс-спектрометрии, однако молекула подобная GA20 присутствовала только в некоторых культурах, но не во всех, тогда как GA9 обнаруживалась лишь в незначительных количествах по сравнению с GA1 и GA4 [91]. Изучение *nod*- и *fix*-мутантов показало, что продукция ГБ не зависит от генов, участвующих в образовании клубеньков и в процессе азотфиксации у *Rhizobium phaseoli*. Для бактериального эндофита *Sphingomonas* sp. LK11, выделенного из листьев бобовых растений *Tephrosia apollinea* (Азия, Африка), была продемонстрирована способность к синтезу физиологически активной GA4 формы ГБ и неак-

тивных GA9 и GA20 форм [92], что сопровождалось способностью увеличивать длину побегов растений томата, содержание хлорофилла и сухой массы [92].

Абсцизовая кислота (АБК). При воздействии засухи обезвоживание клеток является сигналом для быстрого синтеза и накопления АБК, играющей ключевую роль в развитии стрессоустойчивости растений. АБК вовлекается в поддержание водного баланса, регулируя закрытие устьиц и связанное с ним предотвращение избыточной потери влаги. Кроме того, она участвует в передаче стрессовых сигналов и переключении генетических программ с нормы на стресс, связанных с индукцией экспрессии защитных генов [72]. Было показано, что около 2/3 из 2000 индуцируемых засухой генов регулируется АБК [93], что лежит в основе адаптации растений к различным стрессам, приводящим к нарушению водного режима. Хотя прямое участие АБК в контроле роста растений недостаточно изучено, сведения о карликовости АБК-мутантных растений, указывают на ее необходимость в поддержании роста в нормальных условиях [74].

Обнаружено, что некоторые штаммы PGP-бактерий повышают уровни секретируемой растением АБК при воздействии водного стресса. При этом пока не ясно синтезируется ли АБК бактериями или растениями. Более того, было показано, что ингибирование биосинтеза АБК подавляет экспрессию *TaAQP7* — гена белка водного транспорта аквапорина, активность которого возрастает при воздействии водного стресса. Эти сведения указывают на вовлечение АБК в иррегуляцию *TaAQP7* гена в качестве модулятора засухоустойчивости растений. Сообщалось, что продуцирующие АБК бактерии рода *Azospirillum* оптимизировали водный обмен разных видов культурных растений в условиях засухи, что способствовало повышению их урожайности [94, 95]. Штамм *A. brasilense* Sp245 стимулировал накопление АБК в растениях *A. thaliana*, что приводило к снижению уровня транспирации в листьях [96]. В растениях, инокулированных продуцирующими АБК штаммами *A. brasilense* Sp245, *B. licheniformis* RtM10, *P. fluorescens* RtM10 увеличивалось эндогенное содержание АБК, и растения становились устойчивыми к засухе. Растения, обработанные *B. aryabhattai*, характеризовались более высокой устойчивостью к тепловому стрессу и повышенным уровнем продукции АБК, индуцирующей закрытие устьиц в этих растениях [97]. Штаммы *B. subtilis* LDR2, *Arthrobacter protophormiae* SA3 и *Dietzia natronolimnaea* STR1 способствовали поддержанию фотосинтетической активности растений пшеницы в условиях засухи. При этом, *B. subtilis* LDR2 и *Arthrobacter protophormiae* SA3 снижали стресс-индуцируемое накопление АБК и предшественника этилена АЦК, тогда как *Dietzia natrono-*

limnaea STR1 существенного влияния на содержание этих соединений не оказывал [29]. Проростки пшеницы, предобработанные *A. protophormiae* SA3, *D. natronolimnaea* STR1 и *B. subtilis* LDR2 характеризовались усилением экспрессии *TaCTR1* гена, кодирующего ключевой негативный регулятор этиленовой сигнальной трансдукции, а также гена, кодирующего TaDREB2-фактор транскрипции, вовлекаемого в регуляцию формирования устойчивости растений к широкому спектру абиотических стресс-факторов. Повышение устойчивости растений пшеницы к засухе и засолению под влиянием *B. subtilis* LDR2, *A. protophormiae* SA3 и *D. natronolimnaea* STR1 может быть обусловлено одновременным повышением содержания ИУК и снижением АБК и АЦК, а также модулированием активности CTR1-регуляторного компонента этиленового сигналинга и DREB2-транскрипционного фактора [29]. Кроме того, сообщается, что АБК индуцирует толерантность за счет антагонизма передачи сигналов ЦК [41], а после инокуляции PGP-бактериями в условиях стресса увеличивается накопление АБК [98, 99]. Есть свидетельства того, что *B. subtilis* оказывает влияние на рост и толерантность растений через устойчивую регуляцию [100] с участием АБК, которая, в свою очередь, контролируется СК.

Этилен. Этилен вовлекается в регуляцию прорастания семян и выведение их из состояния покоя, однако, если после прорастания его уровень оказывается слишком высоким, замедляется рост и удлинение корней. Одним из механизмов стимуляции PGP-бактериями роста растений является снижение в них уровня этилена путем дезаминирования непосредственного его предшественника АЦК, являющегося источником питания для некоторых видов PGP-бактерий. Реакция протекает при участии ключевого фермента системы этилензависимой регуляции роста растений АЦК-дезаминазы [74]. Использование бактериями АЦК в качестве источника питания приводит к уменьшению его содержания в растениях и, соответственно, сокращению синтеза этилена в корнях и ускорению роста растений. На примере различных видов растений, включая пшеницу, показана эффективность использования PGP-бактерий, продуцирующих АЦК-дезаминазу, для снижения уровня этилена и улучшения роста растений в условиях абиотических стрессов [34, 67, 101]. К примеру, PGP-бактерии *Ochrobactrum pseudogrignonense* RJ12, *Pseudomonas* sp. RJ15 и *B. subtilis* RJ46, продуцирующие АЦК-дезаминазу, подавляли в растениях экспрессию гена АЦК-оксидазы, катализирующей образование этилена АЦК, а также снижение концентрации самого АЦК. Продуцирующие АЦК-дезаминазу бактерии способствовали поддержанию скорости роста корней и побегов и накоплению биомассы растений, подвергнутых водному стрессу [52].

Салициловая и жасмоновая кислоты (СК и ЖК). Во многих исследованиях было показано, что ростстимулирующая и антистрессовая активность PGP-бактерий, в том числе эндофитных, связана с их способностью синтезировать сигнальные молекулы СК и ЖК, играющих ключевую роль в запуске системной индуцированной устойчивости растений к стрессам, обусловленной активацией СК- и ЖК-зависимых защитных сигнальных путей [27, 57, 102–104]. СК или ЖК-зависимые реакции являются доминирующими первичными сигналами местных и системных индуцированных защитных ответов растений в ответ на стрессы [16, 52], и антистрессовый эффект PGP-бактерий на растения может быть связан с их способностью синтезировать эти соединения [22, 27, 103, 105, 106]. СК участвует в регуляции различных физиологических процессов, включая цветение, термогенез, закрытие устьиц и ионный транспорт, а также в инициации защитных реакций растений при биотических и абиотических стрессовых воздействиях [107]. СК играет жизненно важную роль в процессах роста и развития в норме и активно участвует в реакциях растений на засуху через активацию антиоксидантных ферментов, регуляцию экспрессии генов, синтез осмолитов и усиление накопления фотосинтетических пигментов [3, 107]. Имеются данные о том, что сигнальные пути растений, регулирующие развитие защитных реакций в ответ на стрессы, являются ключевыми мишенями PGP-бактерий [22, 49, 57]. Например, обработка *B. subtilis* UMAF6639 способствовала формированию стойкой резистентности дыни к мучнистой росе благодаря активации ЖК- и СК-зависимых защитных реакций [105]. Эндобактерии *B. cereus* AR156 индуцировали системную устойчивость *A. thaliana*, опосредованную NPR-1 и СК-зависимыми сигнальными путями, не оказывая влияния на ЖК/этилен-зависимые пути [22]. Формирование устойчивости нута под влиянием *Pseudomonas* также происходило благодаря продукции фенольных соединений и индукции системной устойчивости через СК-зависимый сигнальный путь [108]. Эндофитные *Achromobacter xylosoxidans* и *B. pumilus* усиливали рост подсолнечника в условиях водного стресса за счет эндогенной продукции СК [105, 109]. У растений табака дикого типа *B. amyloliquefaciens* FZB42 приводил к сверхэкспрессии генов *PR-1a*, *LOX* и *ERF1*, участвующих в СК, ЖК и этилен-зависимых сигнальных путях [110]. При этом остается неясным, как именно эндофитные PGP-бактерии регулируют систему защиты растений от засухи и как индуцированная бактериями система защиты растений взаимодействует с классическими сигнальными путями. Вероятно, влияние PGP-бактерий аналогично действию “слабых” патогенов на растения, однако PGP-бактерии также могут продуцировать

метаболиты с гормональными и сигнальными функциями (ауксины, ЦК, этилен, ГБ, АБК, СК, ЖК) [16, 52]. Недавно было показано, что в нормальных условиях произрастания и при засухе содержание эндогенной СК в растениях пшеницы существенно варьировало в зависимости от их сорта и восприимчивости к засухе, в том числе под влиянием эндофитных бактерий *B. subtilis* 10-4 [49].

Таким образом, продуцируемые эндофитными PGP-бактериями фитогормоны могут участвовать не только в стимуляции роста растений и улучшении минерального питания, но и в их защите от широкого спектра стрессовых воздействий биотического и абиотического происхождения, включая обезвоживание. Однако точная роль продуцируемых эндофитами фитогормонов и механизмы их биосинтеза в растениях еще полностью не выяснены и требуются дальнейшие более углубленные исследования для лучшего понимания взаимодействия бактерий с растениями в условиях засухи.

Продукция других метаболитов и физиологически активных соединений. При воздействии засухи эндофитные PGP-бактерии в тканях растений могут продуцировать множество вторичных метаболитов в виде смеси ЛОС, способствующих ускорению роста растений и снижению повреждающего действие стрессовых факторов [41, 111, 112]. Выявлен широкий спектр ЛОС, продуцируемых PGP-бактериями, включая короткоцепочечные алифатические альдегиды и кетоны, простые и сложные эфиры, спирты, серосодержащие соединения и углеводороды [113, 114]. Синтезируемые PGP-бактериями ЛОС могут функционировать как сигнальные молекулы, играя важную роль в стимуляции роста растений и индукции системной устойчивости при патогенезе. ЛОС и их способ действия обладают дополнительным преимуществом по сравнению с другими системами биоконтроля и регулирования роста, поскольку ЛОС не требуют физического взаимодействия с частями растений или патогенами [115, 116]. К настоящему времени в единой базе данных о микробных ЛОС mVOC 3.0 Database, <https://bioinformatics.charite.de/mvoc/> (mVOC, microbial Volatile Organic Compounds) зарегистрировано более 1000 различных ЛОС, продуцируемых бактериями и грибами [117]. Микробные ЛОС играют важную роль в дистанционной коммуникации микробных сообществ и участвуют, как в коммуникации между микробами, так и между растениями и микробами в ризосфере [118]. Также ЛОС влияют на экспрессию генов, участвующих в гормональной передаче сигналов, защитных путях и вызываемой микробами стресс-устойчивости, вирулентности и образовании биопленок [118, 119]. ЛОС служат сигналами для развития у растений прайминга и системной реакции на стрессы [103, 120]. В усло-

виях засухи замачивание проростков пшеницы *B. thuringiensis* AZP2 увеличивало биомассу растений и увеличивало выживаемость из-за изменения продукции ЛОС и более высокого уровня фотосинтетической активности [121]. При колонизации *P. chlororaphis* 06 в корнях растений образовывался летучий метаболит 2R,3R-бутандиол, способствующий закрыванию устьиц, снижению потери воды и повышению засухоустойчивости [122]. *Alcaligenes faecalis* улучшал рост *A. thaliana* продуцируя смесь ЛОС, которые контролируют пути синтеза ауксина и ГБ, участвующих в росте и развитии корней и побегов в стрессовых условиях [123], а также регулируют транспортеры ионов [124]. Было предположено, что продуцируемые RGP-бактериями ЛОС могут индуцировать устойчивость растений к засухе через СК-зависимый механизм [122, 125], а также через регуляцию образования микробной биопленки вокруг корней [126]. Продуцируемые RGP-бактериями ЛОС также могут действовать как средство биоконтроля и активировать индуцированную системную устойчивость растений [127, 128]. Например, у *A. thaliana* обработка штаммами *Bacillus* sp. GB03 и IN937a способствовала высвобождению бутандиола и ацетона и тем самым значительно снижала тяжесть инфекции, вызванной *Erwinia carotovorasub* sp. *carotovora*, и улучшала рост растений [127].

Эндофитные RGP-бактерии также продуцируют множество других стимуляторов роста растений, например экзополисахариды (ЭПС), ризобитоксин [129], некоторые сигнальные молекулы, такие как люмихром [130] и липохитоолигосахариды [131]. ЭПС являются одним из основных компонентов внеклеточного матрикса бактерий, на которые часто приходится 40–95% веса бактерий [132]. ЭПС представляют собой сложную смесь биомолекул, таких как белки, гуминовые вещества, полисахариды, нейтральные сахара, уроновые кислоты, аминокислоты, органические сложноэфирные заместители и нуклеиновые кислоты, липиды и гликопротеины. Продукция и состав ЭПС зависят от фазы роста бактерий, состава среды и условий окружающей среды [132]. Как было показано, продукция RGP-бактериями таких ЭПС как альгинат и целлюлоза способствует улучшению устойчивости пшеницы к засухе. ЭПС отвечают за создание зоны прикрепления между бактериями и корневой системой, частицами почвы, а также между различными бактериями. Кроме того, продуцируемые бактериями ЭПС увеличивают проницаемость корневой системы и могут образовывать защитную биопленку (действовать как барьер вокруг корней) и улучшать рост растений в условиях дефицита влаги [133]. Если ЭПС-продуцирующие RGP-бактерии находятся в ризосфере растений, они приводят к лучшей агрегации почвы вокруг корней и более эффективному потоку воды и питательных веществ к корням растений

[134, 135]. Показано, что *B. thuringiensis* AZP2 образует большое количество биопленки на корнях пшеницы. В условиях водного стресса вокруг корней пшеницы скапливалось в два-три раза больше почвы по сравнению с неинокулированными растениями, что позволило повысить эффективность использования воды на 63% у инокулированных растений и усилить их выживаемость при засухе [121]. Штамм-продуцент ЭПС *Klebsiella* sp. IG3 улучшал проницаемость прикорневой почвы за счет увеличения агрегации почвы и водного потенциала вокруг корней проростков пшеницы [136]. Секретия ЭПС штаммом *Pantoea agglomerans* NAS206 увеличивала соотношение прилипшей к корню почвы и ткани корня, что позволяло улучшить агрегацию почвы, окружающей корни пшеницы [137]. Это способствовало повышению проницаемости корней в почву и поддержанию лучшего водного потенциала вокруг них, оптимизируя тем самым усвоение воды и питательных веществ растениями [136, 137].

Ризобитоксин может способствовать росту и развитию растений в стрессовых условиях, ограничивая выработку в них этилена. Точно так же сигнальные молекулы люмихром и липохитоолигосахариды могут содействовать в восприятии стрессовых сигналов растениями. Более того, эти молекулы действуют как регуляторы роста в микробах и растениях, влияющие на накопление биомассы, клеточный цикл, эмбриогенез, рост побегов и корней, а также боковое ветвление корней. В частности, эти соединения инициируют симбиотические взаимодействия растений с микроорганизмами ризосферы, защищая растения от негативного воздействия биотических и абиотических стрессов [131]. RGP-бактерии способны к секреции липохитоолигосахаридов, индуцируемых флавоноидами, присутствующими в корневых экссудатах. Известен такой тип бактериоцина как туринин 17 (Th17), продуцируемый различными видами *Bacillus*, который также функционирует как мощное бактериальное сигнальное соединение, способствующее росту растений. Th17 является наиболее широко изученной молекулой бактериоцина из-за его значительного участия в стимулировании роста растений, в частности, прорастания в стрессовых условиях [138].

РАЗВИТИЕ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ RGP-БАКТЕРИЯМИ

В связи с глобальным потеплением климата в последние два десятилетия во многих регионах мира и России наблюдается стойкая тенденция к увеличению частоты возникновения засухи [2, 139, 140]. Ярким примером тому служит лето 2010, 2016 и 2021 гг. [139, 140]. Засуха оказывает негативное влияние на протекание всех звеньев метаболизма растений, что в целом проявляется в

снижении продуктивности и качества урожая культурных растений, включая пшеницу [1, 141–143]. Для яровой пшеницы оптимальной для роста и развития считается температура воздуха от 20 до 25°C [140]. Однако в засушливые годы, к примеру, летом 2010 г температура обычно составляла 32–35°C и иногда приближалась к 40°C во время пика аномальной жары, что привело к существенным потерям урожая. В многочисленных работах было показано, что PGP-бактерии, включая эндобактерии, вносят важный вклад в снижение негативного действия дефицита влаги на растения пшеницы [29, 50, 121, 144]. К примеру, обработка *B. safensis* W10 и *Ochrobactrum pseudo-gregnonense* IP8 оказывала ростстимулирующее и защитное действие на шесть разных сортов пшеницы, подвергнутых засухе, что отражалось в увеличении массы корней, побегов и урожая зерна [145]. Аналогичные данные были получены и при применении других штаммов PGP-бактерий (*Pantoea alhagi*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *Mesorhizobium ciceri*, *A. brasilense*, *A. lipoferum*) на пшенице, которая подвергалась засухе в разные фазы развития, включая период цветения [32, 144, 146–148]. Также показано, что под влиянием PGP-бактерий изменяется архитектура корневой системы и структура тканей корня [149, 150], увеличивается образование боковых корней [32, 151], что приводит к повышению засухоустойчивости пшеницы. *Pseudomonas* sp. E2 и *Azotobacter chroococcum* E1 смягчали неблагоприятное действие засухи на растения пшеницы благодаря поддержанию целостности анатомических структур (толщины эпидермиса, тканей мезофилла и флоэмы, диаметра сосудов ксилемы и размера сосудистых пучков корневой системы), тогда как небактеризованные образцы характеризовались существенными анатомическими нарушениями [152]. Растения пшеницы, праймированные *A. brasilense* Sp24 при воздействии засухи характеризовались более высоким уровнем ОСВ и движения воды по апопласту, а также увеличенными размерами сосудов ксилемы и повышенным уровнем гидравлической проводимости в колеоптиле, что в целом улучшало водный статус инокулированных растений и существенно снижало амплитуду стресс-индуцированных изменений в содержании фосфолипидов [32, 144, 153]. *A. brasilense* и *Herbaspirillum seropedicae* способствовали поддержанию уровня ОСВ, сохранению целостности мембранных структур и повышению устойчивости двух разных сортов пшеницы (CD-120 и Frontana) к засухе [154]. Эффективность PGP-бактерий в повышении засухоустойчивости пшеницы показана не только при отдельном, но и при комбинированном применении разных сочетаний бактериальных культур. К примеру, обработка консорциумом из четырех PGP-бактерий заметно улучшало функциональные характеристики фо-

тосистемы II, скорость транспирации и устьичную проводимость у растений пшеницы в норме и предотвращало резкое изменение указанных параметров в условиях обезвоживания, что отражалось на повышении урожайности зерна [155]. Колонизация растений PGP-бактериями может запускать механизмы, помогающие растениям сохранять фотосинтетическую активность в стрессовых условиях. Например, *B. thuringiensis* AZP2 существенно повышала уровень выживаемости растений пшеницы в условиях засухи за счет снижения уровня выделяемого CO₂ и повышения интенсивности фотосинтеза [121]. Обработка *Burkholderia phytofirmans* PsJN положительно влияла на ОСВ, ассимиляцию CO₂, интенсивность фотосинтеза, содержание хлорофилла, эффективность использования воды и урожайность пшеницы при засухе [156].

Засухоустойчивость — комплексный признак, обусловленный функционированием множества взаимосвязанных механизмов и очевидно, что праймирование PGP-бактериями может вносить свой вклад в настройку реализации этих механизмов, способствуя развитию засухоустойчивости растений. Вместе с тем, эффективность бактериальной инокуляции может сильно варьировать в зависимости от используемого штамма, генотипов растений, условий произрастания, вида стресса [47–50, 157]. К примеру, один и тот же бактериальный штамм может по-разному влиять на продуктивность и энергию роста растений [47], на развитие засухоустойчивости [49, 158] и формирование элементов структуры урожая в зависимости от генотипа пшеницы [50]. Раскрытие механизмов действия PGP-бактерий играет ключевую роль в определении наиболее эффективных путей их применения для максимального снижения повреждающего действия засухи на растения. Несмотря на то, что механизмы, посредством которых PGP-бактерии индуцируют устойчивость растений-хозяев ясны не полностью, очевидно, что в основе реализации индуцированной PGP-бактериями засухоустойчивости лежат множественные механизмы, вовлекающие, наряду с описанной выше гормональной и АЦК-дезаминазной активностями, антиоксидантную защиту, аккумуляцию осмолитов и индукцию системной толерантности к засухе.

Антиоксидантная активность и снижение окислительного стресса. Хорошо известно, что засуха наряду с другими стрессами вызывает в растениях окислительный стресс, возникающий вследствие избыточной генерации активных форм кислорода (АФК), таких как супероксидный анион-радикал (O₂^{•-}), гидроксильный радикал (OH[•]), перекисные радикалы (RO₂[•]), H₂O₂, синглетный кислород (1O₂) и др., обладающих чрезвычайно высо-

кой реакционной способностью. При нарушении баланса между образованием свободных радикалов и их нейтрализацией, они начинают самопроизвольно и неспецифически взаимодействовать с клеточными компонентами, что приводит к серьезным нарушениям структуры и функции мембран, активности ферментов, мутагенезу, остановке клеточного цикла и, в итоге к гибели клеток и всего организма [159, 160]. Обезвреживание АФК в растениях обеспечивается антиоксидантной системой (АОС), все компоненты которой находятся в сложном функциональном взаимодействии, обеспечивая устойчивость растений к стресс-индуцируемым окислительным повреждениям [160]. АОС защиты растений включает антиоксидантные ферменты: пероксидаза (ПО), каталаза (КАТ), аскорбатпероксидаза (АПО), супероксиддисмутаза (СОД), глутатионредуктаза (ГР), и компоненты неферментативной природы: аскорбиновая кислота, глутатион, цистеин, пролин [161].

К настоящему времени накоплены обширные сведения о способности RGP-бактерий индуцировать активность АОС защиты у своих растений-хозяев. К примеру, после инокуляции корней пшеницы *Lactobacillus plantarum* были выявлены активация КАТ и повышение интегральной антиоксидантной емкости в проростках и обнаружено нивелирование вызываемого обезвоживанием окислительного стресса, зарегистрированные по накоплению H_2O_2 и малонового диальдегида (МДА) [162]. *Azospirillum brasilense* NO40 и *Stenotrophomonas maltophilia* B11 заметно снижали вызванные засухой повреждения растений пшеницы, уменьшая утечку электролитов, накопление МДА и H_2O_2 , а также повышая активность КАТ и ПО [35]. Под влиянием RGP-бактерий в растениях пшеницы происходило снижение уровня стресс-индуцируемого перекисного окисления липидов, проницаемости мембран и активности фермента липоксигеназы, повышение активности антиоксидантных ферментов (СОД, КАТ, АПО) в условиях нарушения водного режима [31]. Инокуляция пшеницы *Klebsiella* sp. IG 3 также приводила к гораздо более низкому уровню экзоосмоса электролитов и накоплению МДА в условиях засухи по сравнению с неинокулированными растениями [136]. *A. brasilense* NO40 и *S. maltophilia* B11 значительно уменьшали ингибирующее действие засухи на ОСВ в корнях, побегах и листьях, а также на площадь листьев, содержание фотосинтетических пигментов, аскорбиновой кислоты, белковые структуры корней пшеницы и заметно уменьшали экзоосмос электролитов, накопление МДА и H_2O_2 [35]. При инокуляции и ко-инокуляции с *Bacillus* sp. и *Arthrobacter pascens* в растениях кукурузы увеличивалось содержание сахаров, пролина и возрастала активность антиоксидантных ферментов: СОД, ПО, КАТ и АПО [163]. Аналогичные сведения были получены при ино-

куляции растений пшеницы арбускулярной микоризой, при которой было выявлено увеличение содержания компонентов АОС защиты неферментативной природы, в частности пролина и свободных аминокислот, а также повышение активности ряда антиоксидантных ферментов, таких как ПО и КАТ [164]. Авторы полагают, что колонизация микоризой способствует улучшению осмотической регуляции растений пшеницы при засухе, усиливает их АОС защиты и снижает окислительное повреждение клеток, что в совокупности приводит к повышению засухоустойчивости пшеницы [164]. Имеются данные о вовлечении *A. brasilense* NO40 и *B. amyloliquefaciens* 5113, оказывающих защитный эффект на растения пшеницы при засухе, в регуляцию активности гена АПО *APX1* и ферментов аскорбат-глутатионного комплекса [151]. Показано, что эндофитные бактерии *B. subtilis* оказывают защитное действие на рост и антиоксидантный статус растений пшеницы при засухе посредством стабилизации уровня АПО и ГР [158]. У проростков пшеницы, испытывающих недостаток воды, инокуляция штаммом *B. thuringiensis* AZP2 усиливала активность ферментов, поглощающих АФК, таких как ГР, СОД и КАТ, что приводило к лучшей выживаемости проростков в стрессовых условиях [121]. *B. safensis* W10 и *Ochrobactrum pseudogregnonense* IP8 улучшали активность антиоксидантных ферментов и запускали накопление неферментативных антиоксидантов в растениях пшеницы в условиях засухи [145]. В частности, была увеличена активность ПО, КАТ, АПО, СОД и ГР, тогда как концентрации каротиноидов, аскорбата и пролина также были повышены во время стресса. Изменение этих параметров позволило снизить степень окислительных повреждений что, в конечном счете, привело к увеличению биомассы корней и побегов пшеницы. Однако эти исследования не дают четкого понимания того вызывают ли бактерии повышенное образование антиоксидантов в растениях или снижение окислительных повреждений связано с продукцией антиоксидантов самими бактериями. В некоторых случаях сообщалось о снижении активности антиоксидантных ферментов пшеницы после инокуляции RGP-бактериями. Например, в проростках пшеницы, испытывающих водный стресс, инокуляция штаммами *B. amyloliquefaciens* 5113 и *A. brasilense* NO40 приводила к более слабой активности АПО и дегидроаскорбатредуктазы по сравнению с неинокулированными растениями. Тем не менее, бактериальное инокулирование приводило к снижению уровня окислительного стресса в растениях, их лучшей выживаемости и более высоким параметрам роста, таким как сырая/сухая масса и содержание воды [158, 165].

Продукция осмолитов и снижение осмотического стресса. Мощным защитным механизмом, поз-

воляющим поддерживать водный статус растений в условиях засухи, является аккумуляция осмолитов, вовлекаемых в осмотическую регуляцию клеток, способствующих понижению осмотического потенциала клеточного сока. Различают внутриклеточные осмолиты неорганического происхождения, преимущественно поглощаемые из внешней среды ионы, такие как K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , и органические вещества, синтезируемые и транспортируемые в растениях. И хотя неорганические осмолиты не требуют для накопления больших затрат энергии и углерода, они могут вызвать интоксикацию растений при высоких концентрациях [166]. Для поддержания низкого водного потенциала растения накапливают низкомолекулярные хорошо растворимые во внутриклеточной среде органические соединения, которые не являются токсичными для клетки и в отличие от неорганических ионов не вызывают изменений в метаболизме, поэтому им присваивается наименование совместимых с биополимерами веществ. К ним относятся различные аминокислоты, например пролин, аланин, четвертичные ионы: бетаин, глицин-бетаин; сахароспирты, различные моно- и олигосахариды. Накопление осмолитов обусловлено замедлением оттока ассимилятов из листьев, усилением их биосинтеза и повышением активности гидролитических ферментов. Осмолиты снижают водный потенциал клеточного сока, способствуя тем самым предотвращению потери клетками воды и восстановлению их водоснабжения. Кроме того, осмолиты вовлекаются в защиту конфигурации макромолекул, предотвращая деградацию белков и инактивацию ферментов. Поддержание осмолитами целостности структурных белков способствует сохранению функциональной активности клеточных мембран [167, 168]. Было показано, что в условиях водного стресса PGP-бактерии способны к секреции осмолитов, функционирующих в синергизме с продуцируемыми растениями осмолитами и стимулирующими их рост благодаря регуляции осмотического потенциала клеток корней [26, 169]. Имеются данные, указывающие на повышение стресс-устойчивости растений пшеницы под влиянием PGP-бактерий, опосредованное накоплением различных осмолитов [144, 150, 170].

Важнейшим осмопротектантом растений, обладающим шаперонными свойствами и снижающим степень вызываемых обезвоживанием повреждений клеточных структур, является пролин [3]. Вовлечение пролина в спектр защитного действия PGP-бактерий на различные виды дикорастущих и культурных растений, включая пшеницу, было продемонстрировано в многочисленных исследованиях [16, 26, 50, 57, 169–172]. Например, эндофитные PGP-бактерии смягчали стресс от дефицита воды у растений пшеницы за счет увеличения содержания пролина и измене-

ния архитектуры корней [150]. Использование PGP-бактерий стимулировало прирост биомассы и повышало ОСВ в листьях благодаря аккумуляции пролина в растениях кукурузы при воздействии водного стресса [167]. Растения пшеницы, инокулированные PGP-бактериями и *Piriformo-spora indica*, накапливали большие количества пролина, β -токоферола и каротиноидов по сравнению с неинокулированными растениями, и способствовали снижению повреждающего действия дефицита влаги на растения на уровне клеток и всего растения [31]. Инокуляция штаммом *A. brasilense* Sp245 улучшала осмотическую регуляцию, что приводило к увеличению урожайности пшеницы на 17% [81]. Растения пшеницы, инокулированные *B. safensis* W10 или *Ochrobactrum pseudogregnonense* IP8, демонстрировали увеличение концентрации пролина и ОСВ в листьях в условиях засухи [145]. Совместная инокуляция *B. subtilis* и *A. brasilense* увеличивала (на 30%) продукцию пролина в листьях пшеницы в условиях дефицита воды и способствовали формированию засухоустойчивости [170].

В некоторых случаях сообщалось о снижении содержания осмолитов в растениях, подверженных засухе. Например, инокуляция проростков пшеницы штаммом *Klebsiella* sp. IG 3 приводила к значительному снижению общего содержания растворимых сахаров и пролина в условиях засухи по сравнению с неинокулированными растениями. Однако обработанные эндофитами растения характеризовались увеличением длины и ветвления корней, а также повышением сырой и сухой массы корней и побегов. В таком случае вполне вероятно, что выбранные PGP-бактерии имеют иной способ действия, как например образование биопленок, снижающих уровень воздействия водного стресса [173]. Кроме того, PGP-бактерии могут способствовать защите растений от дефицита влаги, синтезируя другие осмопротектанты, например, трегалозу. Трегалоза представляет собой высокостабильный дисахарид, образованный β -1,1-гликозидной связью между двумя остатками β -глюкозы, способной удерживать значительное количество воды внутри клетки путем связывания ее молекул, образуя гелевую фазу и снижая тем самым степень вызываемого засухой нарушений метаболизма. Кроме того, трегалоза может участвовать в предотвращении деградации и агрегации частично денатурированных белков при обезвоживании клетки. Имеются данные о существенном повышении засухоустойчивости разных видов культурных растений под влиянием бактерий, характеризующихся способностью к повышенной продукции трегалозы или соединений, индуцирующих ее синтез в растениях [174, 175].

ЭНДОФИТНЫЙ МИКРОБИОМ ПШЕНИЦЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

Растения эволюционировали в тесном взаимодействии со множеством микроорганизмов, играющих важную роль в росте, питании и здоровье растений. В настоящее время имеется значительный объем информации о структуре и динамике растительной микробиоты, а также о функциональных возможностях отдельных членов сообщества [37]. Микроорганизмы, тесно связанные с определенным растением (видом или генотипом), независимо от почвы и условий окружающей среды, определяются как коровый микробиом ("core microbiome") растений [176], включающий ключевые микробные таксоны, которые важны для адаптации растений. Напротив, некоторые микробные таксоны, встречающиеся в небольшом количестве на ограниченном участке, называются сателлитными таксонами. В зависимости от географического положения и специфики среды обитания могут определяться разные сателлитные таксоны. За последние годы с развитием новых методов исследований понимание структуры микробиома растений значительно расширилось [176–183]. Хотя термин коровый микробиом широко используется, существуют разногласия по поводу методов, которые следует использовать для определения основных микроорганизмов, ассоциированных с определенным растением-хозяином [184]. К примеру, Симонин с соавт. [181] с использованием трех генотипов пшеницы, выращенных на восьми контрастных почвах Европы и Африки, идентифицировали в коровом микробиоме пшеницы 30 бактериальных, 24 грибных и 10 таксонов, отнесенных к простейшим. В другом исследовании Россман с соавт. [182] выявили в коровом микробиоме современных сортов пшеницы 22 бактериальных и 13 грибных таксона, а также 3 таксона, отнесенных к простейшим. Однако суммирование данных этих двух исследований [181, 182] показало, что только 4 рода бактерий (*Arthrobacter*, *Massilia*, *Bradyrhizobium* и *Nitrospira*), 4 таксона грибов (*Bionectria*, *Exophiala*, *Chaetomium*, и *Fusarium*) и 2 протиста (*Rhizoglyphus* и *Eoecomonas*) оказались общими. Эти данные указывают на высокую степень сложности точной идентификации компонентов корового микробиома растений и необходимость разработки оптимальных методов в решении этой задачи. В настоящее время наиболее точными являются исследования корового микробиома, основанные на метагеномном анализе, которые, однако, проводятся довольно редко [46, 185, 186]. Вместе с тем, согласно накопленным к настоящему времени данным о микробиоме пшеницы, бактерии рода *Sphingomonas* были обнаружены в ~80% исследований; *Bradyrhizobium* в ~70%; *Pseudomonas* и *Massilia* в ~60%; *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Chitinophaga*, *Pantoea*, *Pedobacter*, *Mucilaginibacter* и *Variovorax* в

~50% исследований. Список представленных родов не является исчерпывающим [39], а лишь свидетельствует о том, что с использованием имеющихся методов и инструментов эти роды оказались многочисленными или ключевыми таксонами [39, 186].

Анализ эндофитного микробиома пшеницы был проведен разными авторами в отношении эндофитов разных частей растений (корни, листья, семена) [187–190], разных сортов [181, 188], в разные стадии развития [181, 183, 188]. Результаты показывают, что эндофитные микробные сообщества сильно зависят от органа растения, возраста растения, сорта (генотипа), а также территории выращивания и технологии возделывания [191, 192]. Анализ генетического разнообразия резидентов ризосферы пшеницы [187] показал наличие 30 таксономических единиц, включая классы *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, а также наличие некультивируемых бактерий, функции которых остаются неясными. Другое исследование эндофитов ризосферы проведенное на двух сортах пшеницы (Freed-06 и Chakwal-50) на стадии цветения [188] позволило выявить, что микробное сообщество представлено 8 типами, 14 классами, 14 порядками, 23 семействами и 33 родами эндофитов. Курзняр с соавт. [189] впервые продемонстрировали, что 7 родов бактерий (*Pantoea*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Massilia*, *Methanobacterium*, *Lactobacillus*, *Serratia*) являются обязательными микроорганизмами, колонизирующими семена исследованных ими сортов пшеницы *Triticum aestivum* L. (сорт Hondia) и *T. spelta* L. (сорта Rokosz и Schwabencorn). Причем, *Pantoea* и *Paenibacillus* были идентифицированы как доминанты в изученном семенном материале пшениц. Кроме того, в семенах пшеницы эндофитными бактериями были колонизированы как эндосперм, так и зародыш. Авторы пришли к выводу, что семена пшеницы нельзя рассматривать как стерильные ниши, поскольку они содержат эндофитную микробиоту, которая, в свою очередь, по составу и структуре является индивидуальной для каждого сорта [189]. Выявлено, что эндофитные бактерии, заселяющие зародыши семян даже в небольшом количестве, в дальнейшем во время роста пшеницы способны заселять их корни и/или листья [189]. В условиях *in vitro* обнаружено, что эндофиты присутствовали и в корнях, и в листьях пшеницы сортов Hondia и Rokosz. Однако корни пшеницы являлись более предпочтительными органами для колонизации эндофитами, чем листья, где их биоразнообразие было ограничено. *In vitro* эксперименты также показали, что два рода бактерий — *Paenibacillus* и *Propionibacterium* — имеют статус обязательных микроорганизмов, населяющих растения пшеницы сортов Rokosz и Hondia [189].

Одним из наиболее интересных аспектов изучения эндофитных бактерий является оценка роли факторов внешней среды и генотипа растений в формировании их популяции, а также активности в отношении стресс-факторов среды, включая засуху. Недавно, Зиаровска с соавт. [46] методом метагеномного высокопроизводительного секвенирования и анализа варибельности 16S рРНК охарактеризовали разнообразие эндофитных бактерий в листьях засухоустойчивой и восприимчивой к засухе пшеницы. Результаты показали, что изменения в варибельности бактериальных эндофитов связаны преимущественно с сортовыми (в отношении засухи) характеристиками анализируемых пшениц, а не с характером стрессового воздействия [46]. Растения пшеницы, обработанные ризосферными культурами *Paenibacillus* и *Bacillus*, выделенными из образцов грунта засушливых сред, характеризовались увеличением на 78% показателей роста и биомассы и 5-кратным повышением уровня выживаемости растений в условиях сильной засухи [121]. Тогда как представители этих же видов *Paenibacillus* и *Bacillus*, выделенные из почв умеренно-засушливой зоны, не способствовали повышению засухоустойчивости пшеницы [191].

В то время как микробиомы корневых систем растений были в центре внимания исследователей, микробиом семян в значительной степени игнорировался [191]. В настоящее время многие исследователи сходятся во мнении, что условия засухи оказывают значительное влияние на состав и разнообразие микробиома семян. Постулируется, что микробиом семян развивается в результате отбора хозяевами по признакам, дополняющим геном растения [191]. Предполагается, что микробиомы семян растений, подвергшихся абиотическому стрессу, обогащаются бактериями, более устойчивыми к этому стрессу, и что состав микробиомов семян различается у устойчивых и чувствительных к засухе линий пшеницы [190]. С помощью комбинации метагеномных и культуральных методов Хоне с соавт. [190] анализировали состав микробиома семян четырех засухоустойчивых и двух чувствительных к засухе линий пшеницы, произрастающих в неорошаемых и засушливых условиях с целью выявления микроорганизмов, способных повышать засухоустойчивость растения-хозяина. Коллекция микроорганизмов, выращенных из семян шести линий пшеницы, показала значительные различия в родовом разнообразии и численности в условиях засухи. Роды, принадлежащие к *Gammaproteobacteria*, а именно *Pantoea* и *Pseudomonas*, доминировали в микробиоме семян чувствительных к засухе линий пшеницы, тогда как в засухоустойчивых линиях их было мало. Аналогичная тенденция наблюдалась в микробиоме семян в условиях неорошаемого земледелия и в условиях засухи, где *Pantoea* и *Pseudomonas* истощались в условиях засухи. На-

против, роды, принадлежащие к *Actinobacteria*, подверглись линейно-зависимой селекции засухоустойчивыми линиями пшеницы. Это исследование показало, что микробиомы семян генетически различных линий пшеницы обогащаются полезными бактериями способами, которые являются зависящими, как от генотипа растения-хозяина, так и его реакции на стрессовые воздействия окружающей среды. Таким образом, семена стресс-фенотипированных линий представляют собой бесценный ресурс (резервуар) для выявления и получения культур полезных эндофитов, которые могут быть перспективными при повышении засухоустойчивости сельскохозяйственных культур, в частности, пшеницы [190].

В исследованиях, проведенных Сафином с соавт. [192] было установлено существенное различие в количественных показателях микробиома и бактериальных эндофитов семян разных сортов (генотипов) яровой пшеницы, произрастающих в разных географических зонах Евразии. Семена, выращенные в Средней Азии (республиках Казахстан и Таджикистан), характеризовались большим количеством общего микробиома и эндофитных бактерий, активных в отношении фитопатогенов, в отличие от семян, выращенных в Поволжье (Татарстан, Россия). Выявленные различия могут быть связаны не только с разными климатическими условиями, но и с разными почвенными микробиомами, а также с разными системами агротехники [192]. В связи с этим особый интерес представляет изучение вклада факторов внешней среды, системы агротехники и генома растения. Решение этой проблемы позволит использовать методы трансплантации ценных биологических агентов или целых микробиомов из одних регионов в другие для повышения стресс-устойчивости и урожайности растений. Учитывая, что в Поволжье России уровень использования химических фунгицидов значительно выше, чем в Казахстане и Таджикистане, а активность семенных эндофитов по отношению к фитопатогенам крайне низкая, возможность такого переноса и использование биологических агентов из стран Центральной Азии может быть перспективным для комплексной защиты растений [192]. Такой же подход может быть использован и с целью повышения засухоустойчивости пшеницы. Однако такие сведения в литературе пока отсутствуют. В то же время при разработке технологии переноса биологических агентов из одного региона в другой необходимо учитывать их способность адаптироваться к другим условиям среды, а также их возможные взаимоотношения с аборигенными популяциями эндофитных бактерий. Для сохранения ценных аборигенных эндофитных бактерий семян необходимо провести соответствующую работу по сбору биологического материала в местах с древней историей возделывания пшени-

цы и с минимальным применением химических средств защиты и регуляторов роста растений. Возникает необходимость развития сотрудничества между различными регионами, как Евразии, так и остальных регионов мира в изучении локального набора микробиома семян для разработки эффективных систем защиты для устойчивого развития производства зерна пшеницы [192] в условиях меняющегося климата.

Таким образом, выделение представителей корового микробиома пшеницы, в особенности семян, и последующее определение их функциональных возможностей как *in vitro*, так и *in planta* может стать основой стратегии для разработки новых инокулянтов [39, 189] и безопасного повышения адаптационного и продукционного потенциала растений, в частности, пшеницы, в условиях стрессовых факторов, приводящих к дефициту влаги. В то же время, исследования особенностей микробиома растений пшеницы, произрастающих в разных географических регионах и с разными технологиями возделывания, а также их активности по отношению к абиотическим стрессам находятся в начальной стадии, и это требует дальнейшего изучения.

Совокупность накопленных к настоящему моменту сведений убедительно демонстрирует, что эндофитные RGP-бактерии играют фундаментальную роль в процессах роста и развития, а также адаптации растений пшеницы к условиям засухи. Праймирование семян RGP-бактериями способствует стимуляции роста и развитию засухоустойчивости растений посредством множества прямых и опосредованных механизмов, включая улучшение абсорбции воды, мобилизацию питательных веществ почвы, модуляцию гормонального баланса, усиление антиоксидантной и осмотической защиты растений, продукцию биоактивных соединений и сигнальных молекул.

Таким образом, в растениях под влиянием эндофитов происходит перенастройка фундаментальных метаболических процессов и модулирование биохимических и молекулярных путей, что в целом обуславливает развитие системной толерантности культуры к засухе. Однако сведения о собственном эндофитном микробиоме пшеницы, его функциональных свойствах, а также механизмах взаимодействия собственных и привнесенных бактериальных эндофитов с растениями-хозяевами, особенно в условиях абиотических стрессовых факторов, остаются мало изученными. Дальнейшие исследования эндофитного микробиома и выявление его роли в формировании засухоустойчивости растений пшеницы, несомненно, являются важными и могут быть полезны, как для характеристики семян в селекции яровой пшени-

цы, так и при разработке биопрепаратов на их основе, новых подходов к безопасному управлению продуктивностью и качеством урожая пшеницы в условиях глобальных изменений климата.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ (№ 22-26-00076).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Asseng S., Martre P., Maiorano A., Rötter R.P., O'Leary G.J., Fitzgerald G.J. et al. // Global. Change. Biol. 2019. V. 25. № 1. P. 155–173. <https://doi.org/10.1111/gcb.14481>
2. Pequeno D.N., Hernandez-Ochoa I.M., Reynolds M., Sonder K., MoleroMilan A., Robertson R.D. et al. // Environ. Res. Lett. 2021. V. 16. № 5. P. 054070. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/abd970>
3. Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Maslennikova D.R., Yuldashev R.A., Lastochkina O.V. In: Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants / Ed. N. Khan, R. Nazar, N. Iqbal, N. Anjum. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. 308 p. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25829-9_9
4. Kosova A., Varma A., Choudhary D.K. // Agric. Res. 2015. V. 4. № 1. P. 31–41. <https://doi.org/10.3390/ijms160920913>
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016. <http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf> (2016).
6. Goswami M., Deka S. // Pedosphere. 2020. V. 30. № 1. P. 40–61. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60839-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60839-8)
7. United State Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service // Global Market Analysis: International Production Assessment Division (IPAD). 2020. <https://ipad.fas.usda.gov/>
8. Ehrlich P.R., Wilson E.O. // Science. 1991. V. 253. № 5021. P. 758–762. <https://doi.org/10.1126/science.253.5021.758>
9. Thrupp L.A. // Int. Aff. 2000. V. 76. № 2. P. 265–281. <https://doi.org/10.1111/1468-2346.00133>
10. Galindo F.S., Teixeira Filho M.C.M., Buzetti S., Rodrigues W.L., Santini J. M. K., Alves C.J. // Acta Agric. Scand. Soil Plant Sci. 2019. V. 69. P. 606–617. <https://doi.org/10.1080/09064710.2019.1628293>
11. Dmytryk A., Michalak I., Wilk R., Chojnacka K., G'orecka H., G'orecki H. // Waste Biomass Valori. 2015. V. 6. P. 441–448. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9363-6>
12. Lutts S., Benincasa P., Wojtyla Ł., Kubala S., Pace R., Lechowska K., Quinet M., Garmczarska M. Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique / Ed. S. Araujo, A. Balestrazzi. London, UK: IntechOpen, 2016. 212 p. <https://doi.org/10.5772/64420>
13. Seifikalhor M., Hassani S.B., Aliniaiefard S. // J. Plant Growth Regul. 2020. V. 39. P. 1009–1021. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-10038-7>

14. *Gebeyaw M.* // Int. J. Appl. Agric. Sci. 2020. V. 6. № 6. P. 185–190.
<https://doi.org/10.11648/j.ijaas.20200606.14>
15. *Singh S., Singh U.B., Malaviya D., Paul S., Sahu P.K., Trivedi M., Paul D., Saxena A.K.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020. V. 17. P. 1396.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17041396>
16. *Lastochkina O.V., Aliniaieifard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S.* In: Wheat Production in Changing Environments /Ed. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Hossain. Singapore: Springer, 2019. p. 579–614.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-6883-7_23
17. *Conrath U., Beckers G.J.M., Langenbach C.J.G., Jaskiewicz M.R.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2015. V. 53. P. 97–119.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
18. *Pastor V., Luna E., Mauch-Mani B., Ton J., Flors V.* // Environ. Exp. Bot. 2013. V. 94. P. 45–56.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.013>
19. *Balmer A., Pastor V., Gamir J., Flors V., Mauch-Mani B.* // Tr. Plant Sci. 2015. V. 20. P. 443–452.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.002>
20. *Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W.* // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. № 10. P. 895–914.
<https://doi.org/10.1139/m97-131>
21. *Sood G., Kaushal R., Sharma M.* // Vegetos. 2020. V. 33. № 4. P. 782–792.
<https://doi.org/10.1007/s42535-020-00149-y>
22. *Van Loon L.C.* // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. P. 243–254.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_2
23. *Akram W., Anjum T., Ali B., Ahmad A.* // Int. J. Agric. Biol. 2013. V. 15. № 6. P. 1289–1294.
24. *Maksimov I.V., Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Sarvarova E.R., Khairullin R.M.* // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. № 6. P. 715–726.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060114>
25. *Ma Y.* Plant–microbe Interactions in Agro-ecological Perspectives / Ed. D. Singh, H. Singh, R. Prabha, Singapore: Springer, 2017. 657 p.
https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_4
26. *Dimkpa C., Weinand T., Asch F.* // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. № 12. P. 1682–1694.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
27. *Abdel-Rahman S., Abdel-Kader A.A.S., Khalil S.E.* // Nat. Sci. 2011. V. 9. P. 31–36.
28. *Baez-Rogelio A., Morales-García Y.E., Quintero-Hernández V., Muñoz-Rojas J.* // Microb. Biotechnol. 2016. V. 10. № 1. P. 19–21.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12448>
29. *Barnawal D., Bharti N., Pandey S.S., Pandey A., Chanotiya C.S., Kalra A.* // Physiol. Plant. 2017. V. 161. № 4. P. 502–514.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12614>
30. *Numan M., Bashir S., Khan Y., Mumtaz R., Shinwari Z.K., Khan A. L., Khan A., AL-Harrasi A.* // Microbiol. Res. 2018. V. 209. P. 21–32.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
31. *Singh M., Tiwari N.* // Comm. Integr. Biol. 2021. V. 14. № 1. P. 136–150.
<https://doi.org/10.1080/19420889.2021.1937839>
32. *Arzanesh M.H., Alikhani H.A., Khavazi K., Rahimian, H.A., Miransari M.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 27. № 2. P. 197–205.
<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0444-1>
33. *Cherif H., Marasco R., Rolli E., Ferjani R., Fusi M., Soussi A. et al.* // Env. Microbiol. Rep. 2015. V. 7. № 4. P. 668–678.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12304>
34. *Amna S., Din Y., Sarfraz B., Xia Y., Kamran M.A., Javed M.T. et al.* // Eco. Toxicol. Environ. Saf. 2019. V. 183. P. 109466.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109466>
35. *Kasim W.A., Osman M.E.H., Omar M.N., Salama S.* // Bull. Natl. Res. Cent. 2021. V. 45. № 95. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s42269-021-00546-6>
36. *Rashid U., Yasmin H., Hassan M.N., Naz R., Nosheen A., Sajjad M. et al.* // Plant. Cell. Rep. 2022. V. 41. P. 1–21.
<https://doi.org/10.1007/s00299-020-02640-x>
37. *Compant S., Samad A., Faist H., Sessitsch A.* // J. Adv. Res. 2019. V. 19. P. 29–37.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
38. *Rana K.L., Kour D., Kaur T., Sheikh I., Yadav A.N., Kumar V. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. India. Sect. B: Biol. Sci. 2020. V. 90. № 5. P. 969–979.
<https://doi.org/10.1007/s40011-020-01168-0>
39. *Kavamura V.N., Mendes R., Bargaz A., Mauchline T.H.* // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2021. V. 19. P. 1200–1213.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.045>
40. *Pandey P.K., Singh M.C., Singh S.S., Singh A.K., Kumar M., Pathak M.M. et al.* // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2017. V. 6. № 2. P. 11–21.
<https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.602.002>
41. *Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.M.* // Trend. Plant. Sci. 2009. V. 14. № 1. P. 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
42. *Bokhari A., Essack M., Lafi F.F., Andres-Barrao C., Jalal R., Alamoudi S. et al.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 18154.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>
43. *Bukhat S., Imran A., Javaid S., Shahid M., Majeed A., Naqqash T.* // Microbiol. Res. 2020. V. 238. P. 126486.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126486>
44. *Lastochkina O.V., Baymiev An., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpurnaya I. et al.* // Plants. 2020. V. 9. № 1. P. 76.
<https://doi.org/10.3390/plants9010076>
45. *Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тухонович И.А.* // Экол. генетика. 2019. V. 17. № 1. P. 19–32.
<https://doi.org/10.17816/ecogen17119-32>
46. *Žiarovská J., Medo J., Kysel' M., Zamiešková L., Kačániová M.* // Plants. 2020. V. 9. № 2. P. 266.
<https://doi.org/10.3390/plants9020266>

47. Kazi N., Deaker R., Wilson N., Muhammad K., Trehowan R. // *Field Crops Res.* 2016. V. 196. P. 368–378.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.07.012>
48. Schlemper T.R., Dimitrov M.R., Gutierrez F.A.S., van Veen J.A., Silveira A.P., Kuramae E.E. // *Peer J.* 2018. V. 6. P. e5346.
<https://doi.org/10.7717/peerj.5346>
49. Lastochkina O.V., Garshina D., Ivanov S., Yuldashev R., Khafizova R., Allagulova Ch. et al. // *Plants.* 2020a. V. 9. № 12. P. 1810.
<https://doi.org/10.3390/plants9121810>
50. El-Megeed A., Fayrouz H., Mohiy M. // *Egyptian J. Bot.* 2022. V. 62. № 1. P. 275–290.
51. Ishak Z., Mohd Iswadi M.K., Russman Nizam A.H., Ahmad Kamil M.J., Ernie Eileen R.R., Wan Syaidatul A., Aion H. // *Malays. Cocoa J.* 2016. V. 9. № 1. P. 127–133.
52. Saikia J., Sarma R.K., Dhandia R., Yadav A., Bharali R., Gupta V.K., Saikia R. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 3560.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21921-w>
53. Boleta E.H.M., Galindo F.S., Jalal A., Santini J.M.K., Rodrigues W.L., Lima B.H.D. et al. // *Front. Sustain. Food Syst.* 2020. V. 4. P. 607262.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.607262>
54. Naqqash T., Fatima M., Rehman-ur-Saif, Bukhat S., Shahid M., Shabir C. et al. // *J. Plant. Growth. Regul.* 2021. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1007/s00344-021-10519-8>
55. Федоренко В.Ф., Завалина А.А., Милащенко Н.З. Научные основы производства высококачественного зерна пшеницы. М.: ФГБНУ Росинформагротех, 2018. 396 с.
<https://doi.org/10.25930/skc8-gc14>
56. Di Benedetto N.A., Corbo M.R., Campaniello D., Cataldi M.P., Bevilacqua A., Sinigaglia M., Flagella Z. // *AIMS Microbiol.* 2017. V. 3. № 3. P. 413–434.
<https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>
57. Lastochkina O., Pusenkova L., Yuldashev R., Yuldashev R., Babaev M., Garipova S. et al. // *Plant. Physiol. Biochem.* 2017. V. 121. P. 80–88.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.020>
58. Пищик В.Н., Воробьев Н.И., Мусеев К.Г., Свиридова О.В., Сурин В.Г. // *Почвоведение.* 2015. № 1. С. 87–94.
<https://doi.org/10.7868/S0032180X1501013X>
59. Fukami J., Nogueira M.A., Araujo R.S., Hungria M. // *AMB Express.* 2016. V. 6. № 3. P. 3–16.
<https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>
60. Fukami J., Ollero F.J., Megías M., Hungria M. // *AMB Express* 2017. V. 7. P. 153–163.
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
61. Galindo F.S., Teixeira Filho M.C.M., Buzetti S., Santin J.M.K., Alves C.J., Ludkiewicz M.G.Z. // *Res. Agropec. Bras.* 2017. V. 52. № 9. P. 794–805.
62. Galindo F.S., Teixeira Filho M.C.M., Buzetti S., Santini J.M., Montanari R., Freitas L.A., Rodrigues W.L. // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2019. V. 50. P. 2429–2441.
<https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1667369>
63. Ardakani M.R., Mazaheri D., Mafakheri S., Moghaddam A. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2011. V. 17. № 2. P. 181–192.
<https://doi.org/10.1007/s12298-011-0065-7>
64. Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. // *Plant. Soil.* 2006. V. 287. P. 15–21.
<https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
65. Karimzadeh J., Alikhani H.A., Etesami H., Pourbabaie A.A. // *J. Plant. Growth. Regul.* 2021. V. 40. № 1. P. 162–178.
<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10087-3>
66. Scanlan C.A., Bell R.W., Brennan R.F. Simulating wheat growth response to potassium availability under field conditions in sandy soils. II. Effect of subsurface potassium on grain yield response to potassium fertiliser // *Field Crops Res.* 2015. V. 178. P. 125–134.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.03.019>
67. Chandra D., Srivastava R., Gupta V.V.S.R., Franco C.M., Paasricha N., Saifi S.K., Sharma A.K. // *Plant. Soil.* 2019. V. 441. № 1–2. P. 261–281.
<https://doi.org/10.1007/s11104-019-04115-9>
68. Złoch M., Thiem D., Gadzała-Kopciuch R., Hryniewicz K. // *Chemosphere.* 2016. V. 156. P. 312–325.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.130>
69. Sadeghi A., Karimi E., Dahaji P.A., Javid, M.G., Davand, Y., Askari H. // *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 28. № 4. P. 1503–1509.
<https://doi.org/10.1007/s11274-011-0952-7>
70. Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma, B.K., Bhattacharjee S., Tribedi P. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. № 5. P. 3984–3999.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
71. Albelda-Berenguer M., Monachon M., Joseph E. // *Adv. Appl. Microbiol.* 2019. V. 106. P. 193–225.
<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.12.001>
72. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем, 2001. 160 с.
73. Sgroi V., Cassán F., Masciarelli O.F., Del Papa M.F., Lagares A., Luna V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 85. № 2. P. 371–381.
<https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>
74. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев А.И. // *Изв. УфНЦ РАН.* 2011. № 3–4. С. 5–15.
75. Pankiewicz V.C.S., do Amaral F.P., Santos K.F.D.N., Aguiar B., Xu Y., Schueller M. J., Ferrieri R.A. // *Thy. Plant. J.* 2015. V. 81. № 6. P. 907–919.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12777>
76. Wang C.J., Yang W., Wang C.J., Gu C., Niu D.D., Liu H.X., Guo J.H. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 12. P. e52565.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052565>
77. Wang L., Ruan Y.L. // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 163.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00163>
78. Poupin M.J., Greve M., Carmona V., Pinedo I. // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 492.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00492>
79. Khan N., Ali S., Tariq H., Latif S., Yasmin H., Mehmood A., Shahid M. A. // *Agronomy.* 2020. V. 10. № 11. P. 1683.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10111683>

80. *Egamberdieva D., Kucharova Z.* // Biol. Fertil. Soils. 2009. V. 45. № 6. P. 563–571.
<https://doi.org/10.1007/s00374-009-0366-y>
81. *Creus C.M., Sueldo R.J., Barassi C.A.* // Can. J. Bot. 2004. V. 82. № 2. P. 273–281.
<https://doi.org/10.1139/b03-119>
82. *El-Akhdar I.A., Elshikh M., Allam N.G., Kamal F., Abou-Shanab R., Staehelin C.* // Environ. Biodivers. Soil Secur. 2019. V. 3. P. 15–17.
<https://doi.org/10.21608/jenvbs.2019.16428.1069>
83. *Ali S., Khan N.* // Microbiol. Res. 2021. V. 249. P. 126771.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126771>
84. *Glick B.R.* // Scientifica. 2012. P. 963401.
<https://doi.org/10.6064/2012/963401>
85. *Мартыненко Е.В., Архипова Т.Н.* // Агрохимия. 2010. № 8. С. 35–42.
86. *Xu J., Li X., Luo L.* // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 22. P. 8056–8061.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01276-12>
87. *Егоршина А.А., Хайруллин Р.М., Сахабутдинова А.Р., Лукьянцев М.А.* // Физ. раст. 2012. Т. 59. №. 1. С. 148.
88. *Tsukanova K.A., Meyer J.J.M., Bibikova T.N.* // S. Afr. J. Bot. 2017. V. 113. P. 91–102.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>
89. *Nett R.S., Montanares M., Marcassa A., Lu X., Nagel R., Charles T.C., Peters R.J.* // Nat. Chem. Biol. 2017. V. 13. № 1. P. 69–74.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2232>
90. *Bastián F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Baraldi R., Bottini R.* // Plant. Growth. Regul. 1998. V. 24. № 1. P. 7–11.
<https://doi.org/10.1023/A:1005964031159>
91. *Atzorn R., Crozier A., Wheeler C.T., Sandberg G.* // Planta. 1988. V. 175. № 4. P. 532–538.
<https://doi.org/10.1007/BF00393076>
92. *Khan A.L., Waqas M., Kang S., Al-Harrasi A., Hussain J., Al-Rawahi A., Lee I.J.* // J. Microbiol. 2014. V. 52. № 8. P. 689–695.
<https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>
93. *Huang G.T., Ma S.L., Bai L.P., Zhang L., Ma, H., Jia P., Guo Z.F.* // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 39. № 2. P. 969–987.
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-0823-1>
94. *Cohen A.C., Travaglia C.N., Bottini R., Piccoli P.N.* // Bot. 2009. V. 87. № 5. P. 455–462.
<https://doi.org/10.1139/B09-023>
95. *Cohen A.C., Bottini R., Pontin M., Berli F.J., Moreno D., Boccanlandro H., Piccoli P.N.* // Physiol. Plant. 2015. V. 153. № 1. P. 79–90.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12221>
96. *Bresson J., Varoquaux F., Bontpart T., Touraine B., Vile D.* // New Phytol. 2013. V. 200. № 2. P. 558–569.
<https://doi.org/10.1111/nph.12383>
97. *Park J.W., Balaraju K., Kim J.W., Lee S.W., Park K.* // Biol. Control. 2013. V. 65. № 2. P. 246–257.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.002>
98. *Salomon M.V., Bottini R., de Souza F.G.A., Cohen A.C., Moreno D., Gil M., Piccoli P.* // Physiol. Plant. 2014. V. 151. № 4. P. 359–374.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12117>
99. *Shahzad R., Khan A.L., Saqib B., Waqas M., Kang S.M., Lee I.J.* // Environ. Exp. Botany. 2017. V. 136. P. 68–77.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.010>
100. *Li Y., Xu S., Gao J., Pan S., Wang G.* // Plant Growth Regul. 2016. V. 78. P. 43–55.
<https://doi.org/10.1007/s10725-015-0073-7>
101. *Naing A.H., Maung T.T., Kim C.K.* // Physiol. Plant. 2021. V. 173. № 4. P. 1992–2012.
<https://doi.org/10.1111/ppl.13545>
102. *Forchetti G., Masciarelli O., Alemanno S., Alvarez D., Abdala G.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 76. № 5. P. 1145–1152.
<https://doi.org/10.1007/s00253-007-1077-7>
103. *Chourdary D., Johri B.* // Microbiol. Res. 2009. V. 164. № 5. P. 493–513.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
104. *García-Gutiérrez L., Zerrouh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Pérez-García A.* // Microb. Biotechnol. 2013. V. 6. № 3. P. 264–274.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12028>
105. *Niu D.D., Liu H.X., Jiang C.H., Jiang C.H., Zhang W.Z., Wang Y.P., Guo J.H.* // Mol. Plant Microb. Inter. 2011. V. 24. № 5. P. 533–542.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0213>
106. *Egamberdieva D., Wirth S.J., Alqarawi A.A., Abd Allah E.F., Hashem A.* // FMC. 2017. V. 8. P. 2104.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
107. *Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M., Fatkhutdinova R.A., Fatkhutdinova D.R.* // Plant. Sci. 2003. V. 164. P. 317–322.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00415-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00415-6)
108. *Singh U.P., Sarma B.K., Singh D.P.* // Curr. Microbiol. 2003. V. 46. № 2. P. 131–140.
<https://doi.org/10.1007/s00284-002-3834-2>
109. *Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F.* // Annu. Rev. Phytopathol. 2009. V. 47. P. 177–206.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
110. *Wu L., Huang Z., Li X., Ma L., Gu Q., Wu H., Gao X.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 847.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00847>
111. *Panpatte D.G., Shukla Y.M., Shelat H.N., Vyas, R.V., Jhala Y.K.* In: Microorganisms for Green Revolution / Ed. D.G. Panpatte, Y.K. Jhala, R.V. Vyas, H.N. Shelat. Singapore: Springer, 2017. 443 p.
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-6241-4>
112. *Chiappero J., Cappellari L. del R., Alderete L.G.S., Palermo T.B., Banchio E.* // Ind. Crop. Prod. 2019. V. 139. P. 111553.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111553>
113. *Vaishnav A., Varma A., Tuteja N., Choudhary D.K.* / Ed. D.K. Choudhary, A.K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, N. Tuteja. Singapore: Springer, 2017. 373 p.
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-5553-9>
114. *AlKahtani M.D.F., Fouda A., Attia K.A.* // Agronomy. 2020. V. 10. № 9. P. 1325.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10091325>

115. Park Y.S., Dutta S., An M., Raaijmakers J.M., Park K. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2015. V. 461. № 2. P. 361–365.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.039>
116. Tahir H.A.S., Gu Q., Wu H., Raza W., Hanif A., Wu L., Gao X. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 171.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>
117. Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B. // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. № 1. P. 744–748.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250>
118. Bitas V., Kim H.S., Bennett J.W., Kang S. // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2013. V. 26. № 8. P. 835–843.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0249-CR>
119. Audrain B., Mohamed A.F., Ch.-M. Riu, J.-M. Ghigo // FEMS Microbiol. Rev. 2015. V. 39. № 2. P. 222–233.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>
120. Niinemets Ü. // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. № 3. P. 145–153.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.008>
121. Timmusk S., El-Daim Abd I., Copolovici L., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Niinemets Ü. // PLoS One. 2014. V. 9. № 5. P. e96086.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
122. Cho S.M., Kang B.R., Han S.H., Anderson A.J., Park J.Y., Lee Y.H., Kim Y.C. // APS Pub. 2008. V. 21. № 8. P. 1067–1075.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1067>
123. Bhattacharyya D., Yu S.M., Lee Y.H. // Plant. Growth. Regul. 2015. V. 75. № 1. P. 297–306.
<https://doi.org/10.1007/s10725-014-9953-5>
124. Bhattacharyya D., Lee Y.H. // J. Plant. Physiol. 2017. V. 214. P. 64–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.002>
125. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. // Microbiol. Res. 2016. V. 184. P. 13–24.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
126. Chen Y., Gozgi R., Yan F., Chai Y. // ASM J. 2015. V. 6. № 3. P. e00392.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00392-15>
127. Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Paré P.W. // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 3. P. 1017–1026.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
128. Raza W., Wang J., Wu Y., Ling N., Wei Z., Huang Q., Shen Q. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 17. P. 7639–7650.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7584-7>
129. Vardharajula S., Zulfikar A.S., Grover M., Reddy G., Bandi V. // J. Plant. Interact. 2011. V. 6. № 1. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2010.535178>
130. Dakora F.D., Matiru V.N., Kanu A.S. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 700.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00700>
131. Tanaka K., Cho S.H., Lee H., Pham A.Q., Batek J.M., Cui S., Stacey G. // J. Exp. Bot. 2015. V. 66. № 19. P. 5727–5738.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv260>
132. Bramhachari P.V., Nagaraju G.P., Kariali E. In Role of Rhizospheric Microbes in Soil /Ed. V.S. Meena. Singapore: Springer, 2018. 400 p.
<https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7>
133. Talebi Atouei M., Pourbabae A.A., Shorafa M. // Iranian J. Sci. Technol. Trans. A. 2019. V. 43. № 4. P. 2725–2733.
<https://doi.org/10.1007/s40995-019-00753-x>
134. Alami Y., Achouak W., Marol C., Heulin T. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 8. P. 3393–3398.
<https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000>
135. Awasthi S., Srivastava P., Mishra P.K. // Agric. Res. Technol. 2017. V. 8. № 2. P. 8–10.
<https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.08.555731>
136. Gontia-Mishra I., Sapre S., Sharma A., Tiwari S. // Plant. Biol. 2016. V. 18. № 6. P. 992–1000.
<https://doi.org/10.1111/plb.12505>
137. Amellal N., Burtin G., Bartoli F., Heulin T. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 10. P. 3740–3747.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3740-3747.1998>
138. Subramanian S., Smith D.L. // Front. Plant. Sci. 2015. V. 6. P. 909.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00909>
139. Глобальный климат и почвенный покров России: проявления засухи, меры предупреждения, борьбы, ликвидация последствий и адаптационные мероприятия (сельское и лесное хозяйство). / Ред. Р.С.-Х. Эдельгериев. М.: ООО “Изд. МБА”, 2021. 700 с.
140. Hunt E., Femia F., Werrell C., Christian J.I., Otkin J.A., Basara J., McGaughey K. // Weather. Clim. Extremes. 2021. V. 34. P. 100383.
<https://doi.org/10.1016/j.wace.2021.100383>
141. Okuyama L.A., Federizzi L.C., Barbosa N.J.F. // Ciênc. Rural. 2004. V. 34. № 6. P. 1701–1708.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000600006>
142. Araus J.L., Slafer G.A., Royo C., Serret M.D. // Crit. Rev. Plant Sci. 2008. V. 27. № 6. P. 377–412.
<https://doi.org/10.1080/07352680802467736>
143. Khan M.Y., Zahir Z.A., Asghar H.N., Waraich E.A. // Pak. J. Bot. 2017. V. 49. № 4. P. 1541–1551.
144. Çakmakçı R., Turan M., Ktır N., Güneş, A., Nikerel E., Özdemir B.S., Mokhtari N.E.P. In: Wheat Improvement, Management and Utilization /Ed. R. Wanyera, J. Owuoche. London, UK: IntechOpen Limited, 2017. 394 p.
<https://doi.org/10.5772/63694>
145. Chakraborty U., Chakraborty B.N., Chakraborty A.P., Dey P.L. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. № 5. P. 789–803.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1234-8>
146. Alvarez M.I., Sueldo R.J., Barassi C.A. // Cereal. Res. Commun. 1996. V. 24. № 1. P. 101–107.
147. Hussain M.B., Zahir Z.A., Asghar H.N., Asghar M. // Int. J. Agric. Biol. 2014. V. 16. P. 3–13.
148. Chen C., Xin K., Liu H., Cheng J., Shen X., Wang Y., Zhang L. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 41564.
<https://doi.org/10.1038/srep41564>
149. Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moëgne-Loccoz Y., Muller D., Prigent-Combaret C. // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 356.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>

150. Ullah A., Nisar M., Ali H., Hazrat A., Hayat K., Keerio A.A., Yang X. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. P. 7385–7397.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10045-4>
151. Kasim W.A., Osman M.E., Omar M.N., El-Daim A., Islam A., Bejai S., Meijer J. // J. Plant. Growth. Regul. 2013. V. 32. P. 122–130.
<https://doi.org/10.1007/s00344-012-9283-7>
152. El-Afry M.M. // Acta. Biol. Szeged. 2012. V. 56. № 2. P. 165–174.
153. Pereyra M.A., García P., Colabelli M.N., Barassi C.A., Creus C.M. // Appl. Soil. Eco. 2012. V. 53. P. 94–97.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.007>
154. Furlan F., Saatkamp K., Volpiano C.G., de Assis Franco F., dos Santos M.F., Vendruscolo, E.C.G., da Costa A.C.T. // Sci. Agrar. 2017. V. 18. № 2. P. 104–113.
155. Yaghoubi Khanghahi M.Y., Leoni B., Crecchio C. // Acta. Physiol. Plant. 2021. V. 43. P. 123.
<https://doi.org/10.1007/s11738-021-03289-z>
156. Naveed M., Hussain M.B., Zahir Z.A., Mitter B., Sesitsch A. // Plant Growth Regul. 2014. V. 73. № 2. P. 121–131.
<https://doi.org/10.1007/s10725-013-9874-8>
157. Nemati A., Sedghi M. // J. Crop Prod. 2022. V. 13. № 4. P. 87–110.
<https://doi.org/10.22069/EJCP.2021.18408.2364>
158. Maslennikova D., Lastochkina O. // Plants. 2021. V. 10. P. 2557.
<https://doi.org/10.3390/plants10122557>
159. Мерзляк М.Н. // Соросовский Образ. Журн. 1999. Т. 9. С. 20–26.
160. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., Ястреб Т.О., Луговая А.А. // Вісн. Харків. нац. аграру. ун-ту. Сер. Біологія. 2016. Т. 1. № 37. С. 42–62.
161. Kaushal M., Wani S.P. // Agriculture. Ecosyst. Env. 2016. V. 231. P. 68–78.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.031>
162. Яруллина Д.Р., Асафова Е.В., Картунова Ю.Е., Зиятдинова Г.К., Ильинская О.Н. // Прикл. биохимия микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 189–192.
<https://doi.org/10.7868/S0555109914020196>
163. Ullah S., Bano A. // Can. J. Microbiol. 2015. V. 61. № 4. P. 307–313.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0668>
164. Khalafallah A.A., Abo-Ghalia H.H. // J. Appl. Sci. Res. 2008. V. 4. № 5. P. 559–569.
165. Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. // Funct. Plant Biol. 2003. V. 30. № 3. P. 239–264.
<https://doi.org/10.1071/FP02076>
166. Чжоу К., Юй Б.Д. // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 5. С. 751–758.
167. Sandhya V.D., Ali S., Grover M., Reddy G., Venkateswarlu B. // Plant. Growth. Regul. 2010. V. 62. № 1. P. 21–30.
168. Jogawat A. In: Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology /Eds. A. Roychoudhury, D.K. Tripathi. Willy, 2019. P. 91–97.
<https://doi.org/10.1002/9781119463665>
169. Paul D., Nair S. // J. Basic. Microbiol. 2008. V. 48. № 5. P. 378–384.
<https://doi.org/10.1002/jobm.200700365>
170. Ilyas N., Mumtaz K., Akhtar N., Yasmin H., Sayyed R.Z., Khan W., Ali Z. // Sustainability. 2020. V. 12. № 21. P. 8876.
<https://doi.org/10.3390/su12218876>
171. Gusain Y.S., Singh U.S., Sharma A.K. // Afr. J. Biotechnol. 2015. V. 14. № 9. P. 764–773.
<https://doi.org/10.5897/AJB2015.14405>
172. Shintu P.V., Jayaram K.M. // Trop. Plant. Res. 2015. V. 2. P. 17–22.
173. Camaille M., Fabre N., Clément C., Ait Barka E. // Microorganisms. 2021. V. 9. № 4. P. 687.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040687>
174. Suárez R., Wong A., Ramírez M., Barraza A., Orozco M.D.C., Cevallos M.A., Iturriaga G. // Mol. Plant Microbe Interact. 2008. V. 21. № 7. P. 958–966.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-21-7-0958>
175. Forni C., Duca D., Glick B.R. // Plant Soil. 2017. V. 410. № 1–2. P. 335–356.
<https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>
176. Toju H., Peay K.G., Yamamichi M. // Nat. Plant. 2018. V. 4. P. 247–257.
<https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4>
177. Lahti L., Shetty S., Blake T., Salojärvi J. // Version. 2017. V. 1. № 5. P. 28.
178. Shade A., Stopnisek N. // Curr. Opin. Microbiol. 2019. V. 49. P. 50–58.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.008>
179. Cernava T., Erlacher A., Soh J., Sensen C.W., Grube M., Berg G. // Microbiome. 2019. V. 7. P. 13.
<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0624-7>
180. Kavamura V.N., Robinson R.J., Hayat R., Clark I. M., Hughes D., Rossmann M., Auchline T.H. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 2625.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02625>
181. Simonin M., Dasilva C., Terzi V., Ngonkeu E. L., Diouf D., Kane A. et al. // FEMS Microbiol. Ecol. 2020. V. 96. № 6.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa067>
182. Rossmann M., Pérez-Jaramillo J.E., Kavamura V.N., Chiamonte J. B., Dumack K., Fiore-Donno A.M. et al. // FEMS Microbiol. Ecol. 2020. V. 96. № 4.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa032>
183. Douglas A.J., Hug L.A., Katzenback B.A. // Microb. Ecol. 2020. V. 81. P. 78–92.
<https://doi.org/10.1007/s00248-020-01550-5>
184. Risely A. // J. Anim. Ecol. 2020. V. 89. № 7. P. 1549–1558.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.13229>
185. Schlatter D.C., Yin C., Hulbert S., Paulitz T. // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 86. № 5.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02135-19>
186. Berg G., Rybakova D., Fischer D., Cernava T., Vergès M.C.C., Charles T. et al. // Microbiome. 2020. V. 8. № 1. P. 103.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

187. Velázquez-Sepúlveda I., Orozco-Mosqueda M.C., Prieto-Barajas C.M., Santoyo G. // *Phyton. Int. J. Exp. Bot.* 2012. V. 81. P. 81–87.
188. Naz I., Mirza R.S., Bano A. // *J. Anim. Plant Sci.* 2014. V. 24. № 4. P. 1123–1134.
189. Kuźniar A., Włodarczyk K., Grządziel J., Woźniak M., Furtak K., Gałazka A., Wolińska A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 13. P. 4634.
<https://doi.org/10.3390/ijms21134634>
190. Hone H., Mann R., Yang G., Kaur J., Tannenbaum I., Li T., Spangenberg G., Sawbridge T. // *Sci Rep.* 2021. V. 11. P. 11916.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91351-8>
191. Timmusk S., Paalme V., Pavlicek T., Bergquist J., Vangala A., Danilas T., Nevo E. // *PloS One.* 2011. V. 6. № 3. P. e17968.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017968>
192. Safin R.I., Karimova L.Z., Nizamov R.M., Valiev A.R., Validov S.Z., Faizrakhmanov D.I. // *Adv. Engin. Res.* 2018. V. 151. P. 766–770.
<https://doi.org/10.2991/agrosmart-18.2018.143>

Mechanisms of Growth Promotional and Protective Effects of Endophytic PGP-Bacteria in Wheat Plants Under the Impact of Drought (Review)

O. V. Lastochkina^{a, *} and Ch. R. Allagulova^a

^a *Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

*e-mail: oksana.lastochkina@ufaras.ru

The review is devoted to the analysis and systematization of modern data on the participation of endophytic plant growth-promoting (PGP) bacteria in the regulation of growth, development, yield formation, and stress resistance of cultivated plants, mainly spring wheat as the main bread crop. Presently known data on the interaction of plants with PGP-bacteria under normal and drought conditions are described. Particular attention is paid to the molecular mechanisms of regulation of plant metabolism by PGP-bacteria, as well as their role in reducing the negative effects of drought, achieved by modulating various processes in plants, for example, improving the supply of moisture and mineral nutrients, and activating the antioxidant and osmoprotective plant systems. A key role in the adaptation and resistance/tolerance of plants caused by PGP-bacteria are played by their ability to produce various metabolites with the properties of biologically active substances, including substances with antimicrobial and hormonal activity, enzymes and other compounds. Information about the endophytic microbiome of wheat is given, the elucidation of the role and functions of which in plant stress response and adaptation is necessary for the development of effective, safe strategies for their practical application in order to maximize the adaptation and productive potential of wheat under changing environmental conditions.

Keywords: endophytic PGP-bacteria, seed biopriming, plant-microbe interactions, wheat, drought tolerance

УДК 577.112.083

АНТИФУНГАЛЬНАЯ И РЕАКТИВИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ГЛИЦИН/ГИСТИДИН-БОГАТОГО ЛИНЕЙНОГО ПЕПТИДА ИЗ КОЛОСЬЕВ ПЫРЕЯ ПОЛЗУЧЕГО (*Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski)

© 2023 г. Д. Ю. Рязанцев¹, *, Е. Ю. Ходжаев², А. Е. Куварина³,
А. С. Барашкова¹, Е. А. Рогожин^{1, 3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: rea21@list.ru

Поступила в редакцию 21.06.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Из колосьев пырея ползучего (*Elytrigia repens* L.) комбинацией методов твердофазной экстракции, аффинной хроматографии и аналитической обращено-фазовой ВЭЖХ был выделен новый линейный пептид, не содержащий в своей структуре остатков цистеина. Идентификация его первичной структуры методом автоматической ступенчатой деградации по Эдману позволила выявить наличие нескольких полиглициновых участков, состоящих из 6–8 остатков каждый, между которыми локализованы короткие фрагменты, состоящие из полярных аминокислотных остатков. С-концевой фрагмент молекулы представляет собой положительно заряженный сайт, обогащенный остатками аргинина и гистидина. Особенности структуры данного пептида определяют его функциональность. Так, проверка наличия антимикробных свойств у его рекомбинантного аналога, полученного путем гетерологической экспрессии синтетического гена в прокариотической системе, позволила определить минимальную подавляющую концентрацию (МПК), а то получается московская пивоваренная компания тестируемых культур грибов лишь при достаточно высоких действующих концентрациях (52–104 мкМ). Однако соединение обладало регуляторными свойствами: при концентрации 25 мкМ отмечен реактивирующий эффект, обеспечивающий повышение уровня выживаемости пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200) к УФ-облучению. Полученные данные расширяют представление о функциональных особенностях защитных пептидов растений необычного структурного типа.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, реактивирующая активность, первичная структура, пырей ползучий

DOI: 10.31857/S0555109923010099, **EDN:** CVBXOI

Фундаментальные аспекты изучения молекулярных факторов врожденного иммунитета растений являются основой для решения последующих прикладных задач, направленных, в первую очередь, на повышение устойчивости культур растений к стрессовым факторам окружающей среды и, как следствие, увеличение урожайности и его качества [1]. Широко известной группой так называемых “молекулярных инструментов” иммунной системы растительного организма являются антимикробные пептиды (в более широком понимании — защитные), которые являются как компонентами конститутивного иммунитета, так и в некоторых случаях и индуцированного. На настоящий момент из растений выделено и охарактеризовано около тысячи антимикробных пептидов (АМП), большинство которых классифицировано на не-

сколько семейств согласно их структурным особенностям: дефензины, тионины, липид-переносящие белки, гевеино-подобные пептиды, циклотиды и ноттино-подобные пептиды, снакины, альфа-харпинины [2]. Однако существует целый ряд так называемых неклассифицированных АМП разнообразной структуры, среди которых можно выделить несколько групп молекул, обогащенных остатками определенных аминокислот: пролином (пролин-богатые), глицином/пролином (глицин-пролин-богатые), глицином/гистидином (глицин-гистидин-богатые) и собственно глицином (глицин-богатые) [2–4]. Зачастую такие пептиды обнаруживаются в единичных видах растений, не имеющих широкого распространения и способы их взаимодействия с мишенями (микробными патогенами) имеют преимущественно описательный характер.

Известно, что растения являются богатейшими источниками биологически активных метаболитов, в том числе белков и пептидов с антимикробными свойствами. При этом на долю злаков приходится достаточно ограниченное количество сообщений о наличии в них АМП. Большинство из них выделено из культурных растений пшеницы (*Triticum aestivum*, *T. turgidum*, *T. kiharae*, *T. monococcum*), кукурузы (*Zeamays*), риса (*Oryza sativa*), сорго (*Sorghum bicolor*) и ячменя (*Hordeum vulgare*). При этом подавляющее большинство таких АМП относятся к представителям семейств дефензинов и тионинов [5, 6]. С другой стороны, имеются единичные сообщения о наличии активных АМП у диких злаков, например, сорного растения ежовника обыкновенного, или куриного проса (*Echinochloa crus-galli*) [7–9], а также галофитного колосняка песчаного (*Leymus arenarius*) [10–12].

Пырей ползучий (*Elytrigia repens*) – трудноискореняемое многолетнее сорное растение, наибольший вред от которого регистрируется в посевах культурных злаков, находит ограниченное применение в фитотерапии целого ряда инфекционных заболеваний человека, так как его корневища содержат такие вторичные метаболиты как производные кумариновой и гидроксикоричной кислот [13, 14], флавоноиды, дубильные вещества, а наземная биомасса богата белками лектинами [15]. При этом до настоящего времени отсутствуют данные о наличии в данном растении АМП.

Цель работы – выделение из колосьев пырея нового АМП, его структурный анализ и оценка биологической активности по отношению к спектру коллекционных условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* и дрожжевых грибов.

МЕТОДИКА

Биологический материал. Колосья пырея ползучего (*Elytrigia repens* (L.) Desv. Ex. Nevski) были собраны в Подольском районе Московской области (Россия). Биоматериал хранили в прохладном месте при температуре воздуха 15–17°C.

Тест-культуры *Candida albicans* ATCC 2091, *Aspergillus fumigatus* КПБ F-37 и *A. niger* INA 00760 были взяты из коллекции НИИНА им. Г.Ф. Гаузе. Культура *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200 была взята из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (“ГОСНИИ Генетика”, Москва). Все культуры предварительно выращивали на среде Чапека в пробирках со скошенным питательным агаром, после чего клетки суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland (1.5×10^8 КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Для посева использовали пятисуточные культуры грибов и дрожжей.

Выделение АМП из колосьев пырея. Навеску колосьев (50 г) измельчали до состояния муки на кофемолке (“Bosch”, Германия) и проводили экстракцию смесью (1 М HCl, 1%-ная HCOOH, 1%-ная ТФУ и 1%-ный NaCl) в соотношении 1 : 10 (вес/об.) в течение 1.5 ч при комнатной температуре и интенсивном перемешивании. После этого экстракт (около 420 мл) центрифугировали (“Eppendorf”, Германия) при 6000 g и 4°C в течение 10 мин, отфильтровали через бумажный фильтр и концентрировали на ротаторном испарителе (“IKA-WERKE”, Германия) до конечного объема около 150 мл. К полученному объему приливали около 1000 мл охлажденного ацетона (“Реахим”, Россия) и выдерживали в течение ночи при температуре 4°C. На следующий день осадок отделяли центрифугированием при 3500 g, (4°C, 5 мин) и высушивали в течение 48 ч на воздухе при комнатной температуре. Подсушенный осадок переставляли в 0.1%-ном водном растворе ТФУ (~20 мл) и обессоливали методом ОФ-ВЭЖХ на колонке Aquapore C₈ 10 × 100 мм (“Applied Biosystems”, США). Элюцию проводили ступенчатым градиентом концентрации (0–60%) ацетонитрила в 0.1%-ной водной ТФУ. Собранный элюат упаривали на вакуумной центрифуге (“Labconco”, США), а затем лиофилизировали.

Дальнейшее разделение белково-пептидного экстракта проводили методом псевдоаффинной хроматографии среднего давления на колонке (15 × 60 мм) с Heparin-HiTrapSephарозе (“GE-HealthCare”, США) в ступенчатом градиенте концентрации NaCl (100, 500 и 1000 мМ) в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 7.2, при скорости потока подвижной фазы 3 мл/мин и детекции поглощения при длине волны 280 нм. Элюированную с колонки 100 мМ NaCl фракцию затем рехроматографировали методом аналитической обращено-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac 4.6 × 250 мм (“GraceVydac”, США) в линейном (5–50%) градиенте концентрации 80%-ного ацетонитрила в 0.1%-ной ТФУ за 50 мин с последующим дополнительным элюированием (50–75%) в течение 10 мин. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин, поглощение измеряли при 214 нм.

Рехроматографию активной фракции проводили на колонке ОФ-ВЭЖХ Luna 3.0 × 150 мм (“Phenomenex”, США) с элюцией линейным градиентом концентрации 80%-ного ацетонитрила в 0.1% ТФУ за 30 мин при скорости потока 0.7 мл/мин.

MALDI-TOF/TOF-MS–анализ АМП из колосьев пырея. Анализ АМП осуществляли с помощью установки Autospeed MALDI-TOF (“Bruker Daltonics”, Германия) в режиме положительных ионов. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (DHB) (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 20 мг/мл 80%-ного

ацетонитрила. Раствор анализируемого образца (0.8 мкл) смешивали с эквивалентным объемом матрицы и наносили на мишень. Анализ масс-спектров осуществляли с использованием утилиты mMass – Open Source Mass Spectrometry Tool v. 5.5.0 (<http://www.mmass.org/>).

Определение первичной структуры АМП из колосьев пырея. Первичную структуру АМП из колосьев пырея исследовали методом автоматической ступенчатой деградации по Эдману с использованием секвенатора белков и пептидов PPSQ-33A (“Shimadzu”, Япония) согласно протоколу фирмы-производителя. Для анализа брали 600 пмоль пептида, очищенного методом аналитической ОФ-ВЭЖХ, и растворяли в 30 мкл 50%-ного ацетонитрила с добавлением 0.1%-ной ТФУ. Идентификация полученных первый раз полностью фенилтиогидантоиновых производных аминокислот относительно калибровочного профиля проводили с использованием программного обеспечения (ПО) LabSolution (“Shimadzu”, Япония).

Расчет поверхностного заряда АМП колосьев пырея проводили с помощью ПО GPMW версия 12.5 (“Light House Data”, Дания).

Круговой дихроизм (КД). Пептид растворяли в 40 мкл воды MQ (pH 5.7), а также отдельно в буфере, содержащем 100 mM NaCl, 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.5) для получения раствора с концентрацией 1 мг/мл. Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре J-810 (“Jasco”, Япония) и анализировали с использованием ПО CONTINLL как описано ранее [16].

Спектрофотометрический анализ. Спектры поглощения активных соединений в диапазоне 200–800 нм снимали с использованием спектрофотометра UV-1800 (“Shimadzu”, Япония) с применением кварцевых кювет объемом 2 мл с длиной оптического пути 1 см.

Получение рекомбинантного аналога АМП из колосьев пырея. Для получения рекомбинантного аналога АМП была произведена сборка генетической конструкции для последующей экспрессии синтетического гена, кодирующего данный пептид, в прокариотической системе. Нуклеотидная последовательность была получена из аминокислотной методом обратной трансляции с использованием таблицы частоты использования кодонов для *E. coli*. На 5'-конец полученных последовательностей были добавлены сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I и кодон ATG, кодирующий метионин, на 3'-конец – стоп-кодон и сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *Hind*III. Фрагмент, кодирующий целевой АМП был собран посредством ПЦР-амплификации синтетических олигонуклеотидов (“Евроген”, Россия) с помощью высокоточной полимеразы Phusion-HotStart II DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США) и клонирован в вектор *pJET12blunt*

(“Invitrogen”, США): arAMPg1f: TAGGGTAC-CATGGGAGGTGGAGGTGGA; arAMPg1r: CATAAGCTTTTAAGCAGTGTGTCTATGTCT; arAMPg1-1: TAGGGTACCATGGGAGGTGGAG-GTGGAGGTGGAGGTTATCCAGGTCACG-GAGGTGGAGGTGGAGGATATCCTGGTCAT-GGAGGAGGTGGT; arAMPg1-2: CATAAGCTTTTAAGCAGTGTGTCTATGTCTGTGTCTATGTCTATGTCTACCACCACCTCCTCCAC-CACCTCCTCCATGACCAGGATATCCT.

После отбора клонов методом ПЦР и подтверждения идентичности последовательности нуклеотидов методом дидезоксисеквенирования (“Евроген”, Россия) полученный фрагмент был переклонирован в вектор *pET32b* и в итоге была проведена трансформация клеток *E. coli* штамма Origami. Целевой пептид ассоциирован в составе химерной конструкции с оригинальным белком *E. coli* – тиоредоксином, способствующим, в частности, правильному процессу пространственной укладки пептида. Полученным штаммом *E. coli*, несущим плазмиду, кодирующую гибридный белок, была инокулирована среда LB. К 50 мл ночной культуры бактерий добавляли свежую среду LB (1 л) и подращивали до достижения $\text{OD}_{600} = 0.6$, после чего добавляли индуктор экспрессии ИПТГ до концентрации 1 mM. Культуру выращивали 5 ч, клетки отделяли центрифугированием, а затем суспендировали в буфере для лизиса (50 mM дигидрофосфат натрия, 300 mM хлорид натрия, 10 mM имидазол, pH 8.0) и разрушали методом ультразвуковой дезинтеграции. Для высокоспецифичного выделения гибридного белка осветленный лизат наносили на Ni-NTA-агарозу, после промывки лизирующим и промывочным (50 mM дигидрофосфат натрия, 300 mM хлорид натрия, 20 mM имидазол, pH 8.0) буферами. Белок элюировали буфером следующего состава: 50 mM дигидрофосфат натрия, 300 mM хлорид натрия, 250 mM имидазол, pH 8.0. Гидролиз целевого рекомбинантного пептида от тиоредоксина осуществляли бромцианом по карбоксильной группе остатка метионина, расположенного в полипептидной цепи непосредственно перед N-концевым остатком АМП. Согласно методике [17], к раствору фьюжн-белка в элюирующем буфере после металл-аффинной хроматографии (~15 мл с концентрацией 1.6 мг/мл) добавляли 12 мкл 8 M раствора бромциана в 80%-ном ацетонитриле. Гидролиз проводили в течение 18 ч в темноте, после чего раствор упаривали на вакуумной центрифуге SpeedVac (“Savant”, США). Финальное разделение продуктов реакции осуществляли путем полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке JupiterC₅ 10 × 250 мм 300 Анг (“Phenomenex”, США) в линейном градиенте (10–70%) концентрации ацетонитрила в 0.1%-ной ТФУ, при скорости потока подвижной фазы 4.5 мл/мин и детектировании поглощения при 280 нм.

Антифунгальная активность. Активность определяли методом диско-диффузионного анализа с использованием стерильных бумажных дисков (бумага фильтровальная Ф ГОСТ 12026-76, Россия), смоченных раствором тестируемого пептида и высушенных в стерильных условиях. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с амфотерицином в концентрации 40 мкг/диск (“НИИ Пастера”, Россия).

Определение реактивирующей активности. Реактивирующую активность определяли с использованием культуры *S. cerevisiae* ВКПМ У-1200. При определении биологической активности индивидуального пептида дрожжевые клетки подвергали УФ-облучению (с лампой БУВ-30 мощностью 30 Вт) при длине волны 253.7 нм. Лиофильно высушенный пептид растворяли в 0.3 мл физиологического раствора, добавляли равный объем облученной дрожжевой суспензии, инкубировали в течение 15 мин, а затем готовили разведения суспензий для посева на сусло-агар в 5 повторностях. В качестве контроля использовали суспензии клеток, инкубированных только с физиологическим раствором. Подсчет колоний проводили через 2 сут инкубации при температуре 28°C [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной кислотной экстракции измельченного растительного материала с последующим концентрированием и осаждением суммарного белка ацетоном из 50 г сырой массы было получено 2.1 г осадка. После обессоливания методом ОФ-ВЭЖХ, при котором происходила очистка от низкомолекулярных органических примесей небелковой природы, общий вес обогащенного белково-пептидного осадка в виде лиофилизата составил приблизительно 560 мг, что составляло 1.2% от массы сырого растительного материала.

Согласно оптимизированной универсальной схеме, многократно применённой при выделении АМП из различных видов растений [19], первой стадией грубого фракционирования была псевдоаффинная хроматография на гепарин-сефарозе, которая способна сорбировать молекулы, имеющие положительный заряд [20]. В результате ступенчатого элюирования вещества, имеющего различное сродство к неподвижной фазе были собраны три суммарные фракции (100 мМ, 500 мМ и 1 М NaCl), каждая из которых после обессоливания методом ОФ-ВЭЖХ (см. “Методика”) была проверена на наличие антифунгальных свойств. В результате наибольший диаметр зоны ингибирования роста тестового штамма *A. niger* был отмечен для фракции 100 мМ, которая впоследствии была подвергнута дальнейшему разделению методом аналитической ОФ-ВЭЖХ. По итогам разделения был

получен хроматографический профиль с набором индивидуальных пиков, элюирующихся с колонки преимущественно в интервале 30–50 мин (рис. 1). Стоит отметить, что ограниченное число фракций, которые были получены в результате хроматографического разделения, по всей видимости, связано с присутствием запасных белков, что ранее также было показано для зерна как культурных злаков, так и диких [21, 22]. Ввиду того, что подобные растительные белки имеют молекулярные массы в довольно широком диапазоне, введение дополнительной стадии хроматографической очистки, например гель-фильтрации, далеко не всегда приводит к положительному результату. Проверка собранных фракций показала наличие антифунгальной активности на качественном уровне единственного компонента со временем удерживания 44 мин. По данным масс-спектрометрического анализа для данной фракции был измерен набор сигналов [M + H] в диапазоне 3491.0–4196.0 Да с двумя преобладающими по интенсивности сигналами 3879.3 и 3951.0 соответственно (рис. 2). Последующая рехроматография этой фракции позволила локализовать основное соединение со средней молекулярной массой 3878.3 Да и чистотой 92.5% (данные не приведены). Полученное значение молекулярного веса данного вещества позволило предположить его полипептидную природу, которая была в дальнейшем подтверждена методом автоматической деградации по Эдману. Была установлена первичная структура данной молекулы, состоящая из 43 аминокислотных остатков, не имеющая остатков цистеина и состоящая преимущественно из полиглициновых повторов (рис. 3).

Стоит также отметить, что для пептида характерно наличие двух идентичных мотивов Tug-Pro-Gly-His в N-концевом и центральном фрагментах молекулы, а также поли-Arg/His-последовательности на С-конце. Характерно, что присутствие обилия остатков положительно заряженных аминокислот в структуре пептида, названного ER-GRP, в сочетании, предположительно, с отсутствием стабилизированной пространственной структуры обеспечивает высокий положительный заряд молекулы. Так, при нейтральном значении pH (7.0) его расчетное значение составляло +5.33, тогда как при физиологически нейтральном (5.5) оно доходило до +10.1. Эти расчеты позволили отнести новый АМП колосьев пырея к группе высокоосновных молекул. Поиск гомологий среди аминокислотных последовательностей по базам данных NCBI с применением алгоритма BLASTP среди аннотированных структур царства Растения (Viridiplantae) не выявил гомологичных структур. Среди наиболее близких аналогов ER-GRP можно отметить два представителя группы шеферинов (I и II) плодов сорного растения пастушья сумка (*Capsella bursa-pastoris*) семейства Капустные (*Bras-*

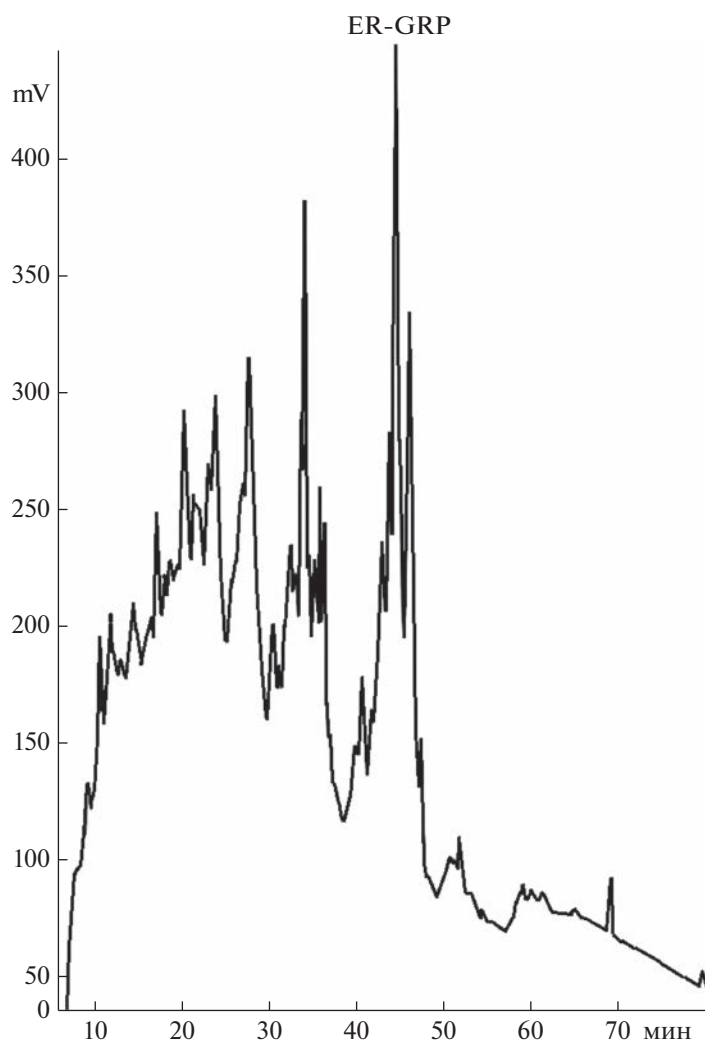


Рис. 1. Профиль ОФ-ВЭЖХ фракции, полученной при элюировании 100 мМ NaCl с колонки Heparin-Sepharose в результате аффинной хроматографии. Отмечен пик, соответствующий пептиду ER-GRP.

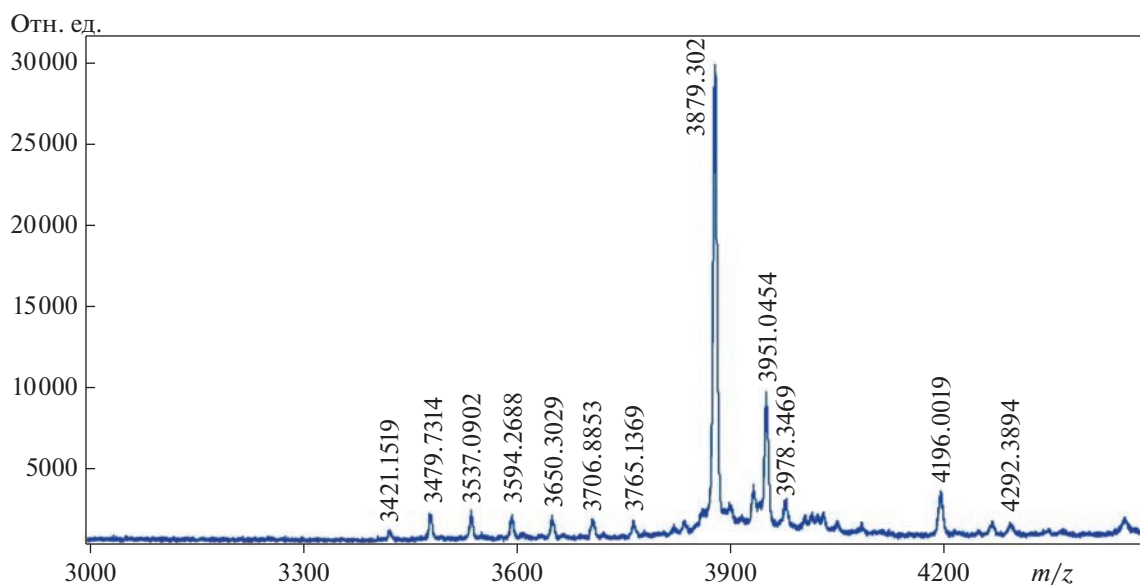


Рис. 2. MALDI-масс-спектрометрический анализ фракции, содержащей АМП ER-GRP.

ER-GRP	GGGGGGGGYPGHGGGG—GGYPGHGGGGGGGGGRRHRRHRRHHTA	43
Shepherin I	-----GYGGHGGHGHGGHGGHGGHGGHGGGGHG-----	28
Shepherin II	GYHGGHGGHGGGYNGGGHGGHGGGYNGGGHGGGGHG	38

Рис. 3. Выравнивание полных аминокислотных последовательностей АМП колосьев пырея (ER-GRP) и ближайших гомологов – шеферинов I и II из плодов пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*).

sicaceae) (рис. 3) [20]. Спектральное определение упорядоченных элементов вторичной структуры рекомбинантного аналога АМП колосьев пырея методом КД показало преимущественное формирование неупорядоченного клубка как в водном, так и в солевом растворе, которое с высокой долей вероятности обеспечивается многочисленными пространственными поворотами полипептидной цепи за счет присутствия остатков глицина.

Таким образом, по совокупности имеющихся данных о структуре пептида можно утверждать, что он обладает уникальной аминокислотной последовательностью и может быть отнесен к структурной группе неклассифицированных АМП растений – глицин/гистидин-богатым пептидам [23]. Характерно, что для некоторых глицин-богатых растительных белков методом молекулярной динамики была предсказана пространственная укладка по типу чередования альфа-спиральных участков, бета-поворотов и элементов неупорядоченного клубка [24].

Для исследования функциональной активности путем гетерологической экспрессии в прокариотической системе был получен рекомбинантный аналог пептида ER-GRP, который изначально был экспрессирован в виде химерного белка с тиоредоксином *E. coli*. Селективный химический протеолиз очищенного белка после аффинной хроматографии осуществляли по карбоксильной группе остатка метионина, локализованного в

линкерном участке между двумя полипептидами, с последующей очисткой целевого пептида препаративной ОФ-ВЭЖХ. В результате из одного литра бактериальной культуры расчетный выход рекомбинантного ER-GRP составил 4.6 мг.

Оценка биологической активности нового АМП из колосьев пырея (*E. repens*) осуществляли, в первую очередь, по его способности ингибировать рост тестовых культур условно патогенных грибов рода *Aspergillus* и дрожжевых грибов *in vitro*. Стоит отметить, что пептид ER-GRP проявил слабые антимикробные свойства. Так, при воздействии на *C. albicans* ATCC 2091 зона подавления роста культуры была отмечена при концентрации 104 мкМ (диаметр составил 9 мм). По отношению к *A. niger* INA 00760 и *A. fumigatus* КПБ F-37 при 52 мкМ, а диаметр зоны ингибирования составил 12 и 10 мм соответственно. При этом двукратное увеличение нагрузки приводило к значительному возрастанию регистрируемого антимикробного эффекта: 25 для первой культуры и 22 мм – для второй (рис. 4). Таким образом, условно патогенные грибы рода *Aspergillus* оказались более чувствительными к действию исследуемого пептида, по сравнению с дрожжевой культурой. В сравнительном аспекте наиболее близкие к ER-GRP гомологи, шаферины I и II из пастушьей сумки (*Capsella bursa-pastoris*) обладали более выраженным антифунгальным эффектом, в первую очередь, по отношению к дрожжевым культурам рода *Candida* в широком диапазоне

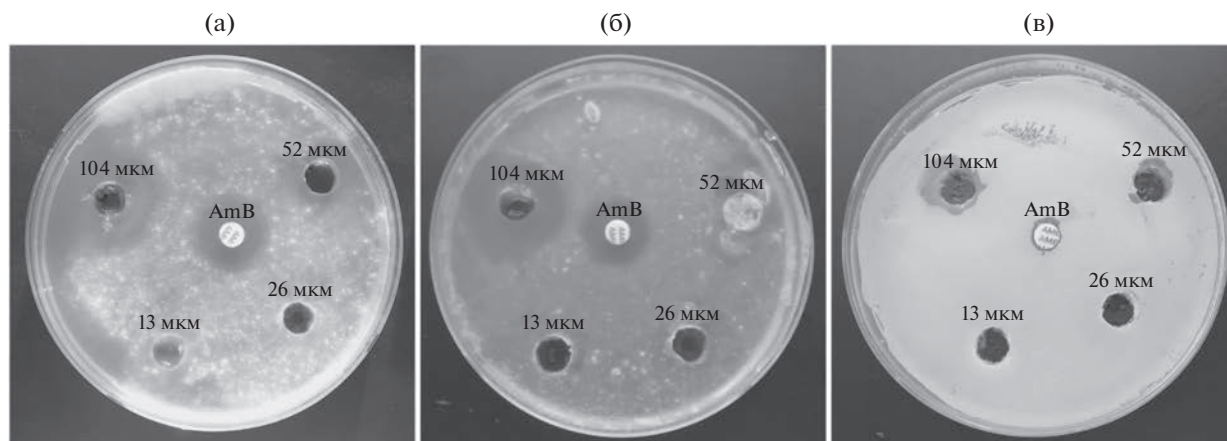


Рис. 4. Диско-диффузионный метод определения антифунгальной активности ER-GRP в отношении следующих культур: *Aspergillus niger* INA 00760 (а), *A. fumigatus* КПБ F-37 (б), *Candida albicans* ATCC 2091 (в).

Таблица 1. Реактивирующее действие АМП из колосьев пырея на подвергнутые стрессу клетки дрожжей *S. cerevisiae**

ER-GRP (конечная концентрация, мкМ)	КОЕ/мл, (выживаемость, %)		
	до стресса (K1) (%)	после стресса и инкубации с физ. р-ром (K2) (%)	после стресса и инкубации с пептидом (%)
52.0	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.025×10^6 (0.042)
26.0	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.022×10^6 (0.0367)
13.0	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.016×10^6 (0.0267)
7.5	60×10^6 (100)	0.014×10^6 (0.023)	0.015×10^6 (0.025)

* Доза УФ-облучения суспензии *S. cerevisiae* – 80 Дж/м².

действующих концентраций (1.56–50 мкМ) [25] и одновременно слабым эффектом против условно патогенных грибов, в частности, из рода *Aspergillus* [20].

При проверке пептида ER-GRP на способность к реактивирующему действию, обеспечивающему повышение уровня выживаемости пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1200) после УФ-облучения в пределах концентраций 7.5–52 мкМ, при 26 мкМ наблюдали ее достоверное увеличение в среднем в 1.46 раза по сравнению с контрольным вариантом (табл. 1). Характерно, что в случае аппликации биологически активного пептида растительного происхождения реактивирующее действие на культуру *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1200, подвергшуюся жесткому воздействию УФ-облучения, было выражено значительно меньше, чем при использовании реактивирующего фактора из *Luteococcus japonicus* sbsp. *casei*, который по химической природе также представлял короткий линейный пептид [26].

Таким образом, выделен и охарактеризован новый пептид из колосьев пырея ползучего (*E. repens*) не содержащий в своей структуре остатков цистеина, а имеющий ряд чередующихся полиглициновых участков между которыми локализованы фрагменты, состоящие из полярных аминокислотных остатков. С-концевой фрагмент молекулы представляет собой положительно заряженный сайт, обогащенный остатками аргинина и гистидина. Функциональная характеристика данного пептида позволила установить наличие двух типов биологической активности – слабой антифунгальной и более выраженной реактивирующей, что является в достаточной степени уникальным примером участия одной и той же молекулы в иммунитете растений к стрессовым факторам как биотической, так и абиотической природы. Полученные данные расширяют представление о функциональных особенностях защитных пептидов растений необычного структурного типа, и позволит в дальнейшем обозначить подходы к их классификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10073-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van der Weerden N.L., Bleackley M.R., Anderson M.A. // Cell. Mol. Life Sci. 2013. V. 70. № 19. P. 3545–3570. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
2. Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. // Pharmaceuticals (Basel). 2015. V. 8. № 4. P. 711–757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>
3. SarikaIquebal M.A., Rai A. // Peptides. 2012. V. 36. № 2. P. 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.012>
4. Das K., Datta K., Karmakar S., Datta S.K. // Protein Pept. Lett. 2019. V. 26. № 10. P. 720–742. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190619112438>
5. Stec B. // Cell. Mol. Life Sci. 2006. V. 63. № 12. P. 1370–1385. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5574-5>
6. Parisi K., Shafee T.M.A., Quimbar P., van der Weerden N.L., Bleackley M.R., Anderson M.A. // Semin. Cell. Dev. Biol. 2019. V. 88. P. 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>
7. Рогожин Е.А., Одинцова Т.И., Мусолямов А.Х., Смирнов А.Н., Бабаков А.В., Егоров Ц.А., Гришин Е.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 403–409.
8. Рязанцев Д.Ю., Рогожин Е.А., Цветков В.О., Ярулина Л.Г., Смирнов А.Н., Завриев С.К. // Доклады Академии Наук. 2019. Т. 484. № 1. С. 104–106.
9. Odintsova T.I., Rogozhin E.A., Baranov Yu.V., Musolyatov A.Kh., Yalpani N., Egorov Ts.A., Grishin E.V. // Biochimie. 2008. V. 90. P. 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.06.007>
10. Уткина Л.Л., Жабон Е.О., Славохотова А.А., Рогожин Е.А., Шиян А.А., Гришин Е.В., Егоров Ц.А., Одинцова Т.И., Пухальский В.А. // Генетика. 2010. Т. 46. № 12. С. 1–7.
11. Slavokhotova A.A., Shelenkov A.A., Odintsova T.I. // Plant Mol. Biol. 2015. V. 89. № 3. P. 203–214. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0346-6>
12. Odintsova T.I., Slezina M.P., Istomina E.A. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 7. E. 1029. <https://doi.org/10.3390/biom10071029>

13. Koetter U., Kaloga M., Schilcher H. // Part I. Planta Med. 1993. V. 59. № 3. P. 279–280.
<https://doi.org/10.1055/s-2006-959672>
14. Beydokhti S.S., Sendker J., Brandt S., Hensel A. // Fito-terapia. 2017. V. 117. P. 22–27.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.12.010>
15. Кароматов И.Д. // Биология и интегративная медицина. 2017. № 6. С. 122–128.
16. Provencher S.W., Glöckner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 33–37.
<https://doi.org/10.1021/bi00504a006>
17. Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // Anal. Biochem. 2010. V. 407. № 1. P. 144–146.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023>
18. Воробьева Л.И., Рогожин Е.А., Ходжаев Е.Ю., Володяшкин Р.А., Самойленко В.А. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 684–695.
19. Barashkova A.S., Rogozhin E.A. // BMC Plant Methods. 2020. V. 16. E. 143.
<https://doi.org/10.1186/s13007-020-00687-1>
20. Park C.J., Park C.B., Hong S.S., Lee H.S., Lee S.Y., Kim S.C. // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. № 2. P. 187–197.
<https://doi.org/10.1023/a:1006431320677>
21. Hilton H., Gaut B.S. // Genetics. 1998. V. 150. № 2. P. 863–872.
<https://doi.org/10.1093/genetics/150.2.863>
22. Gorinstein S., Jaramillo N.O., Medina O.J., Rogrigues W.A., Tosello G.A., Paredes-Lopez O. // J. Protein Chem. 1999. V. 18. № 6. P. 687–693.
<https://doi.org/10.1023/a:1020610424625>
23. Czolpinska M., Rurek M. // Front Plant. Sci. 2018. V. 8. № 9. E. 302.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00302>
24. Pelegrini P.B., Murad A.M., Silva L.P., Dos Santos R.C., Costa F.T., Tagliari P.D. et al. // Peptides. 2008. V. 29. № 8. P. 1271–1279.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.013>
25. Remuzgo C., Oewel T.S., Daffre S., Lopes T.R., Dyszy F.H., Schreier S. et al. // Amino Acids. 2014. V. 46. № 11. P. 2573–2586.
<https://doi.org/10.1007/s00726-014-1811-2>
26. Рогожин Е.А., Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Герасимов Е.С. // Микробиология. 2019. Т. 88. № 2. С. 137–143.

Antifungal and Reactivation Activity of a Novel Glycine/histidine-rich Linear Peptide from Dog-grass (*Elytrigia repens* (L.) Desv. ex Nevski) EARS

D. Yu. Ryazantsev^{a, *}, E. Yu. Khodzaev^b, A. E. Kuvarina^c, A. S. Barashkova^a, and E. A. Rogozhin^{a, c}

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^c Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: rea21@list.ru

Using a combination of solid-phase extraction, affinity chromatography, and analytical reverse-phase HPLC, a new linear peptide was isolated from dog-grass (*Elytrigia repens*) ears, which does not contain cysteine residues. Identification of its primary structure by Edman automated degradation made it possible to reveal the presence of several polyglycine regions, each consisting of 6–8 residues, between which short fragments consisting of polar amino acid residues are localized. The C-terminal fragment of the molecule is a positively charged site enriched in arginine and histidine residues. The structural features of this peptide determine its functionality. Thus, checking the presence of antimicrobial properties in its recombinant analogue, obtained by heterologous expression in a prokaryotic system, made it possible to determine the MIC for the tested fungal cultures only at sufficiently high active concentrations (52–104 µM). However, this compound had regulatory properties: at a concentration of 25 µM, a reactivating effect was noted, which increased the level of survival of *Saccharomyces cerevisiae* to UV-irradiation. The data obtained expand the understanding of the functional features of plant defense peptides of an unusual structural type.

Keywords: antimicrobial peptides, reactivation activity, primary structure, dog-grass

УДК 547.99+615.015.43

НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ α -АМИЛАЗЫ ИЗ *Rhaponticum uniflorum*

© 2023 г. Д. Н. Оленников¹, *, Н. И. Кашенко¹

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Основной стратегией лечения сахарного диабета является контроль постпрандиального уровня глюкозы, в связи с чем α -амилаза поджелудочной железы, гидролизующая сложные углеводы, является важной ферментативной мишенью для научных исследований. В настоящем исследовании водный экстракт и его этилацетатная фракция (ЭАФ) из семян *Rhaponticum uniflorum* оказывали выраженный ингибиторный эффект на активность панкреатической α -амилазы человека. В результате хроматографического разделения из ЭАФ впервые были выделены и охарактеризованы 16 метаболитов, включая 4-*O*-, 5-*O*-, 3,4-ди-*O*-, 3,5-ди-*O*-, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 6-гидроксилитеолин 7-*O*-глюкозид, раунозид В, лютеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид, лютеолин, картамозид, картамогенин, трахелозид, изоферулоил-серотонин, 20-гидроксиэкдизон, 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон и новое природное соединение, которое представляло собой картамогенин 4-*O*-(6"-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид (6"-*O*-ацетил-картамозид). Данные количественной ВЭЖХ указывали на различное распределение индивидуальных компонентов между эндоспермом и кожурой семени. Исследование влияния соединений на активность панкреатической α -амилазы человека показало, что некоторые флавоноиды, кофеилхинные кислоты, лигнаны и производные серотонина оказывали выраженное ингибиторное действие. Полученные результаты подтверждают вывод о том, что семена *Rhaponticum uniflorum* могут быть полезным природным источником для разработки средств, ингибирующих α -амилазу.

Ключевые слова: *Rhaponticum uniflorum*, панкреатическая α -амилаза человека, ингибиторы, фенольные соединения

DOI: 10.31857/S0555109923010063, EDN: CUYJIV

Сахарный диабет является серьезной проблемой здравоохранения во всем мире, лечение которого без каких-либо побочных эффектов по-прежнему остается большой проблемой. Постпрандиальная гипергликемия, связанная с нарушением углеводного обмена, считается наиболее опасным фактором, вызывающим возникновение и постепенное ухудшение течения сахарного диабета [1]. Ингибиторы панкреатической α -амилазы, фермента играющего ключевую роль в расщеплении сложных углеводов, рассматриваются в качестве эффективных средств для профилактики и лечения таких метаболических расстройств как диабет и ожирение [2]. Растения являются важным источником химических соединений, способных подавлять активность α -амилазы и оказывать положительный биологический эффект на организм человека. В традиционной восточной медицине для лечения диабета применяли различные растительные средства, в том числе сибирский вид *Rhaponticum uniflorum* (L.) DC. (*Leuzea uniflora* (L.)

Holub, *Stemmacantha uniflora* (L.) Dittrich) семейства Compositae (Asteraceae), отвары семян которого использовались для лечения мочеизнурения [3]. Данные литературы указывают на присутствие в корнях и траве *R. uniflorum* экидистероидов [4], полисахаридов [5], сесквитерпенов [6], флавоноидов [4] и гидроксициннаматов [7], однако метаболиты семян *R. uniflorum* ранее не изучались. Продолжая поиски растительных ингибиторов α -амилазы [8], представляло интерес определить химические соединения — носители биологического эффекта семян *R. uniflorum* для их дальнейшего практического применения в качестве потенциальных противодиабетических агентов.

Цель работы — исследование химического состава отвара семян *R. uniflorum*, выделение основных соединений и определение их ингибиторного влияния на активность панкреатической α -амилазы человека.

МЕТОДИКА

Общие экспериментальные условия. Семена *R. uniflorum* были собраны в Прибайкальском районе (Республика Бурятия, Россия) и высушены в микроволновой вакуумной камере Муссон-1 ("ПК Ингредиент", Россия) до влажности <5%. Образец сырья хранится в гербарии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (№ BU-COM-0920/29-428).

Для колоночной хроматографии использовали полиамид, нормально- (SiO_2) и обращено-фазовый силикагель (ОФ- SiO_2), сефадекс LH-20, оксид алюминия (Al_2O_3) ("Sigma-Aldrich", Сент-Луис, США). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 ("ОКБ Спектр", Россия).

Масс-спектры регистрировали на TQ-масс-спектрометре LCMS-8050 ("Shimadzu", Япония) [7], спектры ЯМР — на спектрометре VXR 500S ("Varian", США). Препаративную ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence ("Shimadzu"), снабженном колонкой Shim-pak PREP-ODS (20×250 мм, $d = 15$ мкм) и фотодиодным детектором SPD-M30A ("Shimadzu"), при скорости — 1.0 мл/мин и температуре колонки 20°C.

Экстракция и выделение соединений из семян *R. uniflorum*. Измельченное сырье (1 кг) экстрагировали водой (1 : 15, 90°C) трижды, после чего водный экстракт упаривали досуха в вакууме (320 г). Экстракт обрабатывали последовательно гексаном, этилацетатом и бутанолом при температуре кипения в аппарате Соклета до истощения, что приводило к получению гексановой (20 г), этилацетатной (ЭАФ, 55 г) и бутанольной фракций (125 г). Фракцию ЭАФ далее анализировали методом хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием, ВЭЖХ-ДМД-МС) на TQ-масс-спектрометре LCMS-8050 ("Shimadzu", Япония) в условиях, описанных ранее [7]. Для выделения индивидуальных соединений ЭАФ (50 г) разделяли методом колоночной хроматографии на полиамиде (1.5 кг; элюент вода — фракция А, 60%-ный этанол — фракция В, 0.5%-ный аммиак в 90%-ном этаноле — фракция С). Фракцию А (25 г) хроматографировали на колонке с Al_2O_3 (2×50 см, хлороформ—метанол 100 : 0 $\rightarrow$ 70 : 30), а затем на колонке с ОФ- SiO_2 (1×20 см, вода—ацетонитрил 95 : 5 $\rightarrow$ 70 : 30), что привело к выделению 20-гидроксиэкдизона (10 г) и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизона (140 мг).

Для разделения фракций В (15 г) и С (18 г) применяли колоночную хроматографию на Сефадексе LH-20 (2×90 см) с элюцией в градиенте метанол—вода 90 : 10 $\rightarrow$ 0 : 100, в результате чего были получены 10 фракций, которые далее хроматогра-

фировали на колонке с SiO_2 (2×40 см, этилацетат—этанол 100 : 0 $\rightarrow$ 70 : 30), а затем на колонках с ОФ- SiO_2 (1×20 см, вода—ацетонитрил 95 : 5 $\rightarrow$ 50 : 50) и Сефадексе LH-20 (1×60 см, метанол—вода—уксусная кислота 90 : 5 : 5 $\rightarrow$ 20 : 75 : 5). Для дополнительной очистки применяли препаративную ВЭЖХ, используя воду и ацетонитрил в качестве элюентов I и II, соответственно (программа элюирования: 0–40 мин 5–30% I в II, 40–90 мин 30–45% I в II, 90–120 мин 45–58% I в II). В результате из фракции В были выделены 6-гидроксилитеолин 7-*O*-глюкозид (1.5 г), трахелозид (1.0 г), картамозид (5.5 г), литеолин (80 мг) и картамогенин (900 мг), а из фракции С — 6"-*O*-ацетил-картамозид (40 мг), 4-*O*-кофеилхинная кислота (80 мг), 5-*O*-кофеилхинная кислота (8.2 г), 3,4-ди-*O*-кофеилхинная кислота (55 мг), 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (4.5 г), 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота (45 мг), раунозид В (1.2 г), литеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид (1.5 г) и изоферулоил-серотонин (820 мг). Идентификацию выделенных соединений осуществляли по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии [4–7, 9].

6"-*O*-Ацетил-картамозид {картамогенин 4-*O*-(6"-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид, 15}. $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$,

УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 324. $[\alpha]_{20}^D -5.3$ (с 0.7, MeOH). HR-ESI-MS, m/z : 573.421 ($[\text{M}-\text{H}]^-$; расчетное значение 573.557 для $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{O}_{12}$). ESI-MS, m/z : положительная ионизация — 613 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 597 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 575 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 571 $[(\text{M} + \text{K}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$, 555 $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$, 551 $\{[(\text{M} + \text{H}) + \text{H}_2\text{O}] - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}\}^+$, 533 $[(\text{M} + \text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$, 371 $[(\text{M} + \text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$, 353 $[(\text{M} + \text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 - \text{H}_2\text{O}]^+$, 247, 219; отрицательная ионизация — 619 $[(\text{M}-\text{H}) + \text{HCOOH}]^-$, 609 $[(\text{M}-\text{H}) + 2\text{H}_2\text{O}]^-$, 577 $\{[(\text{M}-\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}] + \text{HCOOH}\}^-$, 573 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 567 $\{[(\text{M}-\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}] + 2\text{H}_2\text{O}\}^-$, 531 $[(\text{M}-\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$, 369 $[(\text{M}-\text{H}) - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$. Спектр ЯМР ^1H (500 Гц, 300 К, MeOH- d_4 , δ , м.д.): картамогенин: 7.20 (1H, д, $J = 2.0$, H-2), 6.83 (1H, д, $J = 7.8$, H-5), 7.18 (1H, дд, $J = 7.8, 2.0$, H-6), 7.53 (1H, д, $J = 2.0$, H-7), 6.70 (1H, д, $J = 2.0$, H-2'), 7.26 (1H, д, $J = 8.0$, H-5'), 6.75 (1H, дд, $J = 8.0, 2.0$, H-6'),

3.01 (1H, дд, $J = 14.0, 5.6$, H-7'_A), 3.78 (1H, дд, $J = 14.0, 9.0$, H-7'_B), 4.11 (1H, м, H-8'), 4.41 (1H, дд, $J = 9.0, 7.0$, H-9'_A), 4.27 (1H, дд, $J = 9.0, 2.0$, H-9'_B), 3.85 (3H, с, OCH₃), 3.75 (3H, с, OCH₃), 3.70 (3H, с, OCH₃); 4-*O*-глюкоза: 5.05 (1H, д, $J = 7.5$, H-1"), 3.53 (1H, м, H-2"), 3.50 (1H, м, H-3"), 3.38 (1H, м, H-4"), 3.85 (1H, м, H-5"), 4.50 (1H, дд, $J = 12.0, 2.0$, H-6"), 4.25 (1H, дд, $J = 12.0, 5.4$, H-6"_B); 6"-*O*-ацетил: 1.61 (3H, с, CH₃CO). Спектр ЯМР ^{13}C (125 Гц,

300 К, MeOH- d_4 , δ , м.д.): картамогенин: 128.5 (C, C-1), 116.9 (CH, C-2), 150.7 (C, C-3), 149.5 (C, C-4), 113.1 (CH, C-5), 125.4 (CH, C-6), 138.7 (CH, C-7), 129.8 (C, C-8), 174.3 (C, C-9), 132.3 (C, C-1'), 114.3 (CH, C-2'), 149.2 (C, C-3'), 151.2 (C, C-4'), 115.3 (CH, C-5'), 121.8 (CH, C-6'), 38.0 (CH₂, C-7'), 41.5 (CH, C-8'), 71.5 (CH₂, C-9'); 4-*O*-глюкоза: 102.2 (CH, C-1"), 74.5 (CH, C-2"), 77.7 (CH, C-3"), 71.2 (CH, C-4"), 75.0 (CH, C-5"), 64.8 (CH, C-6"); 6"-*O*-ацетил: 19.7 (CH₃, CH₃CO), 170.5 (C, CH₃CO).

Картамозид (картамогенин 4-*O*- β -D-глюкопиранозид, 12). Спектр ЯМР ¹H (500 Гц, 300 К, MeOH- d_4 , δ , м.д.): 4-*O*-глюкоза: 5.01 (1H, д, J = 7.6, H-1"), 3.50 (1H, м, H-2"), 3.47 (1H, м, H-3"), 3.35 (1H, м, H-4"), 3.43 (1H, м, H-5"), 3.58 (1H, дд, J = 12.1, 1.9, H-6"_A), 3.40 (1H, дд, J = 12.1, 5.6, H-6"_B). Спектр ЯМР ¹³C (125 Гц, 300 К, MeOH- d_4 , δ , м.д.): 4-*O*-глюкоза: 102.4 (CH, C-1"), 74.5 (CH, C-2"), 77.9 (CH, C-3"), 70.8 (CH, C-4"), 76.2 (CH, C-5"), 60.9 (CH, C-6").

Гидролиз. Для осуществления кислотного гидролиза навеску 6"-*O*-ацетил-картамозида (5 мг) нагревали с 2 М ТФУ (4 мл) при 100°C в течение 2 ч, далее гидролизат упаривали в вакууме досуха. Сухой остаток растворяли в 50%-ном этаноле (2 мл) и пропускали раствор через полиамидный картридж (3000 мг, "Capital Analytical", Великобритания), элюируя последовательно водой (50 мл; элюат I) и 70%-ным этанолом (100 мл; элюат II). Для выявления присутствия моносахаридов порцию элюата I дериватизировали 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном и анализировали методом ВЭЖХ, как описано ранее [10]. Для определения принадлежности моносахаридов к D- и L-ряду в элюате I использовали метод восстановительного аминирования с L-триптофаном [11] с последующим анализом методом ВЭЖХ [10]. Гидролиз с 0.5%-ной NaOH проводили как описано ранее [12].

Биологическая активность. Влияние экстрактов, фракций и индивидуальных соединений на активность α -амилазы изучали спектрофотометрическим методом [8] с использованием α -амилазы поджелудочной железы человека (400 ед./мл; "Lee Biosolutions", США), α -амилазы слюнной железы человека (тип IX-A, 3000 ед./мг белка; "Sigma-Aldrich") и α -амилазы поджелудочной железы свиней (тип I-A, 1000 ед./мг белка; "Sigma-Aldrich"). Акарбоза использовалась в качестве положительного контроля. Ингибиторная активность выражалась величиной IC₅₀ (концентрация, вызывающая 50% ингибирование активности фермента) в мкг/мл, которую определяли графически после построения зависимости ингибиторной активности от концентрации.

Для ВЭЖХ-микрофракционирования использовали условия хроматографического анализа,

указанные в работе [7], при которых отдельные фракции собирались каждые 30 с. После этого элюаты концентрировали досуха и растворяли в 50 мкл 50%-ного метанола, добавляли 50 мкл воды, 2.5 мл 2%-ной суспензии крахмала, окрашенного ремазол-бриллиантовым синим R ("Sigma-Aldrich"), 500 мкл α -амилазы поджелудочной железы человека (0.4 ед./мл), инкубировали 50 мин при 37°C. Оптическую плотность пробы определяли при длине волны 620 нм [8]. Элюаты с наиболее выраженным ингибированием фермента предотвращали образование синего комплекса, в противоположность неактивным пробам, которые давали интенсивное окрашивание. Отсутствие активности определялось для фракции со временем удерживания 0.5–1.0 мин.

Тест на летальность. Цисты *Artemia salina* (50 мг; "Арсал", Россия) инкубировали при 25°C в 1 л искусственной морской воды ("Sigma-Aldrich"), в которую через 24 ч вносили 15 мл 0.06%-ной суспензии дрожжей и продолжали инкубацию еще 48 ч. Для анализа на одну пробу отбирали 10 живых личинок *Artemia salina*, которых помещали в 5 мл искусственной морской воды, содержащей исследуемое вещество (20–2000 мкг/мл) или 0.9%-ный раствор NaCl (контроль). Через 24 ч проводили подсчет живых личинок, после чего рассчитывали показатель 50%-ной летальности с применением программы MediCalc ("MedCalc Software Ltd", Бельгия).

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимость различий средних определяли с помощью многогранового теста Дункана. Отличия при $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния водного отвара (ВО) *R. uniflorum* на активность трех α -амилаз млекопитающих показало, что он демонстрировал наибольшее ингибирование α -амилазы поджелудочной железы человека – IC₅₀ 397.11 мкг/мл (табл. 1). После экстракции ВО различными растворителями были получены фракции, из которых наиболее активной оказалась этилацетатная фракция (IC₅₀ 96.25 мкг/мл), для исследования которой было проведено ее разделение с применением хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-ДМД-МС) и колоночной хроматографии.

Согласно данным ВЭЖХ-ДМД-МС в этилацетатной фракции семян *R. uniflorum* было выявлено присутствие 16 соединений (1–16), идентификацию которых осуществляли по результатам определения хроматографической подвижности (рис. 1а), УФ-, масс-спектров (табл. 2) в сравнении с известными соединениями и данными ли-

Таблица 1. Показатели 50%-ного ингибирования активности (IC_{50} , мг/мл) α -амилазы млекопитающих препаратами из *R. uniflorum* (мг/мл $\pm$ SD)

Препарат	α -Амилаза		
	поджелудочная железа человека	поджелудочная железа свиней	слюнные железы человека
Водный отвар (ВО)	$397.11 \pm 12.42^*$	>500	$495.63 \pm 15.84^*$
Гексановая фракция ВО	>500	>500	>500
Этилацетатная фракция ВО	$96.25 \pm 2.98^*$	$163.14 \pm 5.05^*$	$126.03 \pm 3.52^*$
Бутанольная фракция ВО	$363.15 \pm 11.25^*$	>500	$402.56 \pm 11.65^*$
Акарбоза (вещество сравнения)	57.34 ± 1.61	32.65 ± 0.97	81.16 ± 2.59

* Отличия достоверны при $p < 0.05$ в сравнении с группой акарбозы.

температуры, а также после выделения и анализа спектров ЯМР (рис. 2).

Компоненты 1, 2, 5, 6 и 8 обладали близким УФ-профилем, типичным для производных кофейной кислоты [13], а характер масс-спектров указывал на присутствие фрагмента хинной кис-

лоты ацилированного одним (1, 2) или двумя (5, 6, 8) ее остатками [4]. Учитывая хроматографическую подвижность компонентов в сравнении с веществами-референтами, указанные соединения были идентифицированы как 4-*O*-кофеилхинная (1), 5-*O*-кофеилхинная (2), 3,4-ди-*O*-ко-

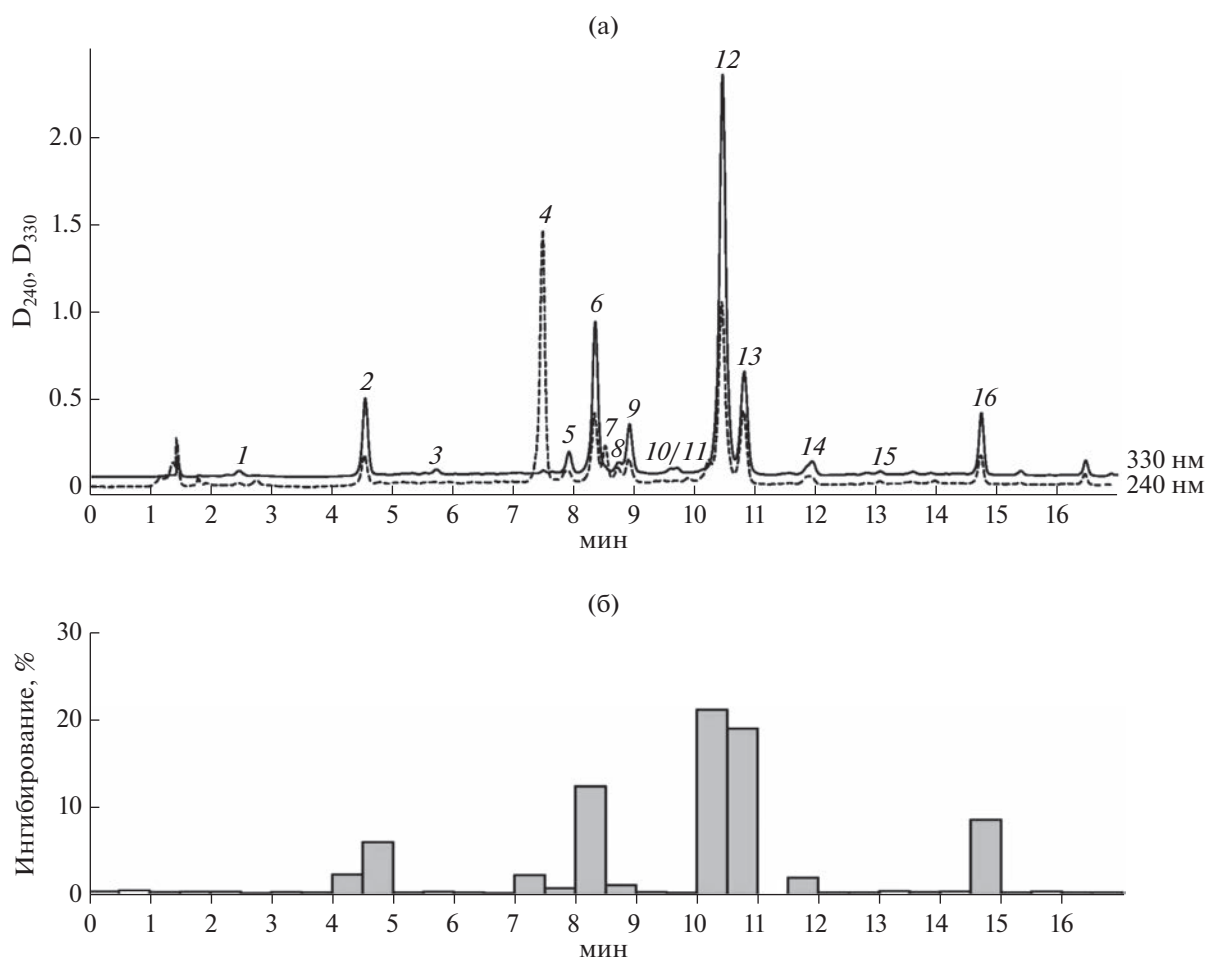


Рис. 1. Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД) этилацетатной фракции семян *Rhaponticum uniflorum* при 240 и 330 нм (а) и ингибиторная активность ВЭЖХ-элюатов в отношении панкреатической α -амилазы (б). Номера пиков соединений соответствуют обозначениям в табл. 2.

Таблица 2. Хроматографическая подвижность (t_R), молекулярная формула, данные УФ- (λ_{max}) и масс-спектров соединений 1–14, 16 из семян *R. uniflorum*

№	Соединение	t_R , мин	Формула	УФ, λ_{max} , нм	Данные масс-спектров, m/z			
					положительная ионизация		отрицательная ионизация	
					$[M + H]^+$	дополнительные ионы	$[M - H]^-$	дополнительные ионы
1	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	2.48	$C_{16}H_{18}O_9$	326	355	—	353	191
2	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	4.51	$C_{16}H_{18}O_9$	326	355	—	353	707, 191
3	6-Гидроксилитеонин 7- <i>O</i> -глюкозид	5.79	$C_{21}H_{20}O_{12}$	271, 345	465	303	463	301
4	20-Гидроксизидонин	7.47	$C_{27}H_{44}O_7$	241	481	519, 503, 463, 445, 427, 409, 371, 347, 329, 303, 301	479	525, 515
5	3,4-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	7.92	$C_{25}H_{24}O_{12}$	325	517	—	515	563, 353, 191
6	3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	8.39	$C_{25}H_{24}O_{12}$	325	517	—	515	563, 353, 191
7	2-Дезокси-20-гидроксизидонин	8.52	$C_{27}H_{44}O_6$	243	465	503, 487, 447, 429, 411	463	509, 499
8	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	8.72	$C_{25}H_{24}O_{12}$	325	517	—	515	563, 353, 191
9	Трахелозид	8.90	$C_{27}H_{34}O_{12}$	280	551	589, 573, 389	549	595, 387
10	Раунозид В	9.58	$C_{30}H_{26}O_{13}$	253, 283, 347	595	303	593	463, 301
11	Лютеонин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -кофеил)-глюкозид	9.67	$C_{30}H_{26}O_{14}$	270, 295, 336	611	287	609	447, 285
12	Картамозид	10.45	$C_{27}H_{32}O_{11}$	325	533	571, 555, 551, 371, 353, 247, 219	531	577, 567, 369
13	Изоферулоил-серотонин	10.86	$C_{20}H_{20}N_2O_4$	292, 314	353	391, 375, 177	351	397, 175
14	Лютеонин	11.93	$C_{15}H_{10}O_6$	266, 345	287	—	285	—
16	Картамогенин	14.79	$C_{21}H_{22}O_6$	331	371	353, 247, 219	369	—

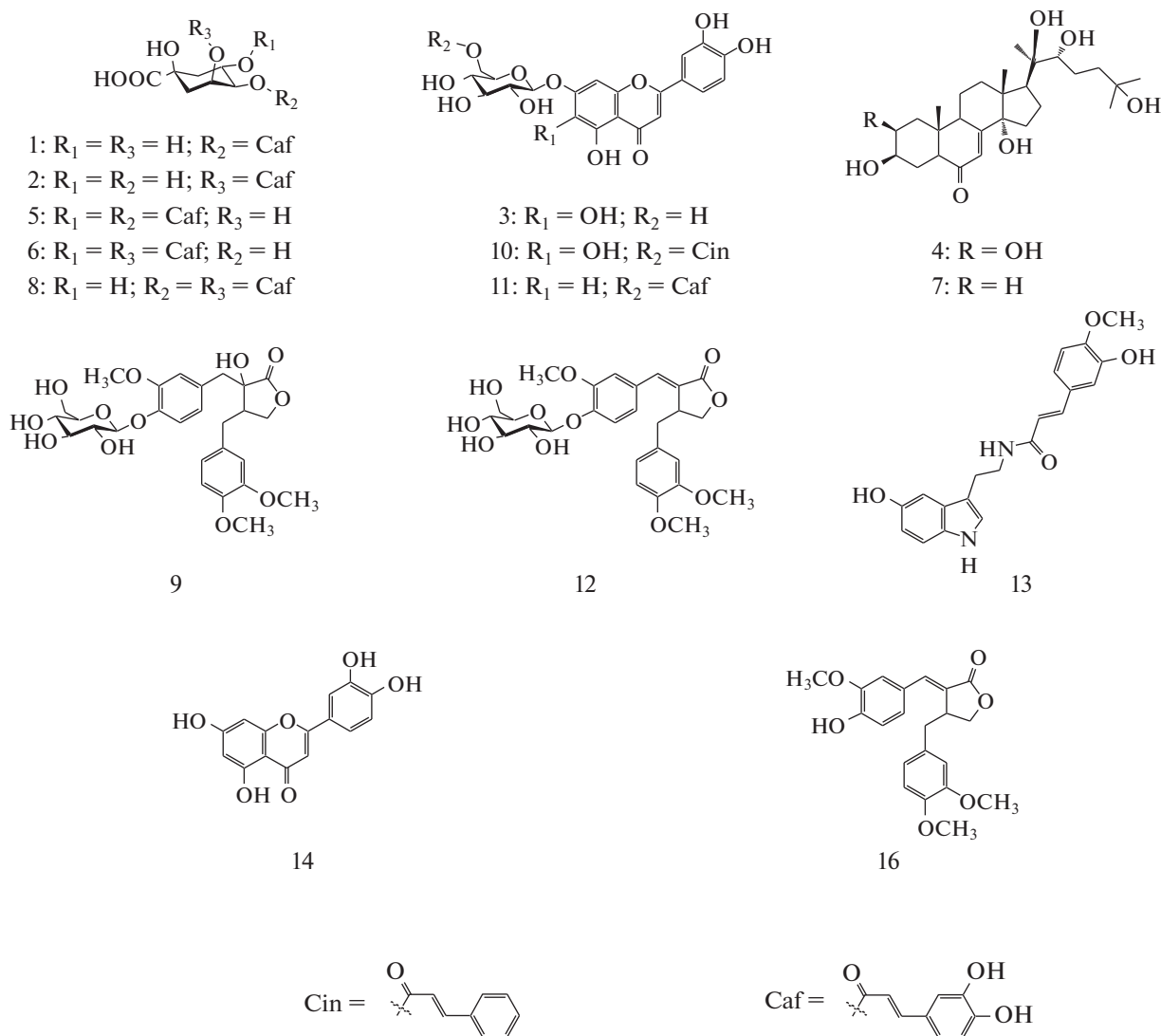


Рис. 2. Структурные формулы соединений, обнаруженных в семенах *R. uniflorum*: 1 – 4-*O*-кофеилхинная кислота, 2 – 5-*O*-кофеилхинная кислота, 3 – 6-гидроксилитеолин 7-*O*-глюкозид, 4 – 20-гидроксиэкдизон, 5 – 3,4-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 6 – 3,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 7 – 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон, 8 – 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 9 – трахелозид, 10 – раунозид В, 11 – литеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид, 12 – картамозид, 13 – изоферулоил-серотонин, 14 – литеолин, 16 – картамогенин.

феилхинная (5), 3,5-ди-*O*-кофеилхинная (6) и 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислоты (8).

Близким к кофеилхинным кислотам УФ-профилем обладали компоненты 12 и 16. В масс-спектре отрицательной ионизации соединения 12 присутствовали сигналы депротонированной частицы (m/z 531) и ее фрагмента, обусловленного удалением гексозильного остатка (m/z 369). В спектре положительной ионизации были отмечены сигналы частиц с m/z 247 и 219, характерных для лигнановых производных типа 7,8-дидегидроарктигенина [9]. После выделения и анализа спектров ЯМР соединение 12 было идентифицировано как картамозид (картамогенин-4-*O*-глюкозид), ранее выделенный из семян *Rhaponticum*

carthamoides [9] и впервые обнаруженный у *R. uniflorum*. Соединение 16 было определено как агликон картамозида – картамогенин. Близким к 12 масс-спектральным профилем обладал компонент 9, молекулярная масса которого была на 18 а.е.м. больше, что характерно для производных гидроксиарктигенина [9]. Хроматографические и спектральные параметры 9 и лигнанового гликозида трахелозида (трахелогенин-4-*O*-глюкозид) были идентичны, что позволило впервые выявить его присутствие в *R. uniflorum*. Данное соединение часто встречается в семенах различных видов Compositae, в том числе и *R. carthamoides* [9].

Соединение 13 обладало типичным для производных изоферуловой кислоты спектром поглоще-

нием с $\lambda_{\max}$ у 292 и 314 нм, а также масс-спектральным профилем, отмеченным ранее для эфиров *N*-цинамоил-серотонина [9]. После выделения и дополнительной ЯМР спектральной характеристики 13 было идентифицировано как *N*-транс-изоферулоил-серотонин, впервые обнаруженный в *R. carthamoides* [9]. Ранее в *R. uniflorum* данное соединение выявлено не было.

Два соединения 4 и 7 были идентифицированы как экдистероиды по характерному для данной группы соединений УФ- и масс-спектрометрическому профилю. Компоненты содержали в масс-спектрах положительной ионизации набор сигналов, отнесенных к протонированной частице и частицам аддуктов с ионами Na^+ и K^+ , а также набор сигналов, вызванных постепенным удалением воды боковой группы и др. После сравнения с данными известных веществ 4 и 7 были идентифицированы как 20-гидроксиэкдизон и 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон, соответственно. Оба соединения ранее были обнаружены в траве и корнях *R. uniflorum* [7].

Соединения 3, 10, 11 и 14 были определены как флавоноиды ввиду характерного для производных флавоноидов типа поглощения в УФ-области спектра [13]. После анализа полученных данных с таковыми известных соединений компоненты были определены как 6-гидроксильтеолин 7-*O*-глюкозид (3), раунозид В (10), лютеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид (11) и лютеолин (14), которые ранее были выявлены в листьях и цветках *R. uniflorum* [4], но обнаружены в семенах этого вида впервые.

Соединению 15 соответствовала молекулярная формула $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$ по данным масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР ^{13}C . В масс-спектре положительной ионизации присутствовали сигналы протонированного иона (m/z 575) и частиц, образованных последовательным удалением фрагмента ацетильной группы (m/z 575 $\rightarrow$ 533) и остатка гексозы (m/z 533 $\rightarrow$ 371), что так же наблюдалось в спектре отрицательной ионизации (рис. 3а, 3б). Спектр поглощения был близок к спектрам лигнановых гликозидов (рис. 3в). После гидролиза с 0.5%-ным NaOH наблюдалось образование картамозида, а гидролиз с 2 М ТФУ приводил к образованию картамогенина и D-глюкозы. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C были близки к таковым картамозида (картамогенин 4-*O*- β -D-глюкопиранозид) за исключением присутствия дополнительных сигналов ацетильной группы в спектре ^1H (δ_{H} 1.61) и ^{13}C (δ_{C} 19.7, 170.5) м.д. Сдвиг в слабое поле сигналов H-6" (δ_{H} 3.40, 3.58 $\rightarrow$ 4.25, 4.50) и C-6" (δ_{C} 60.9 $\rightarrow$ 64.8) в сравнении с картамозидом указывал на присутствие заместителя по положению C-6" глюкопиранозы, которым оказалась ацетильная группа, на что указывали корреляции в спектре

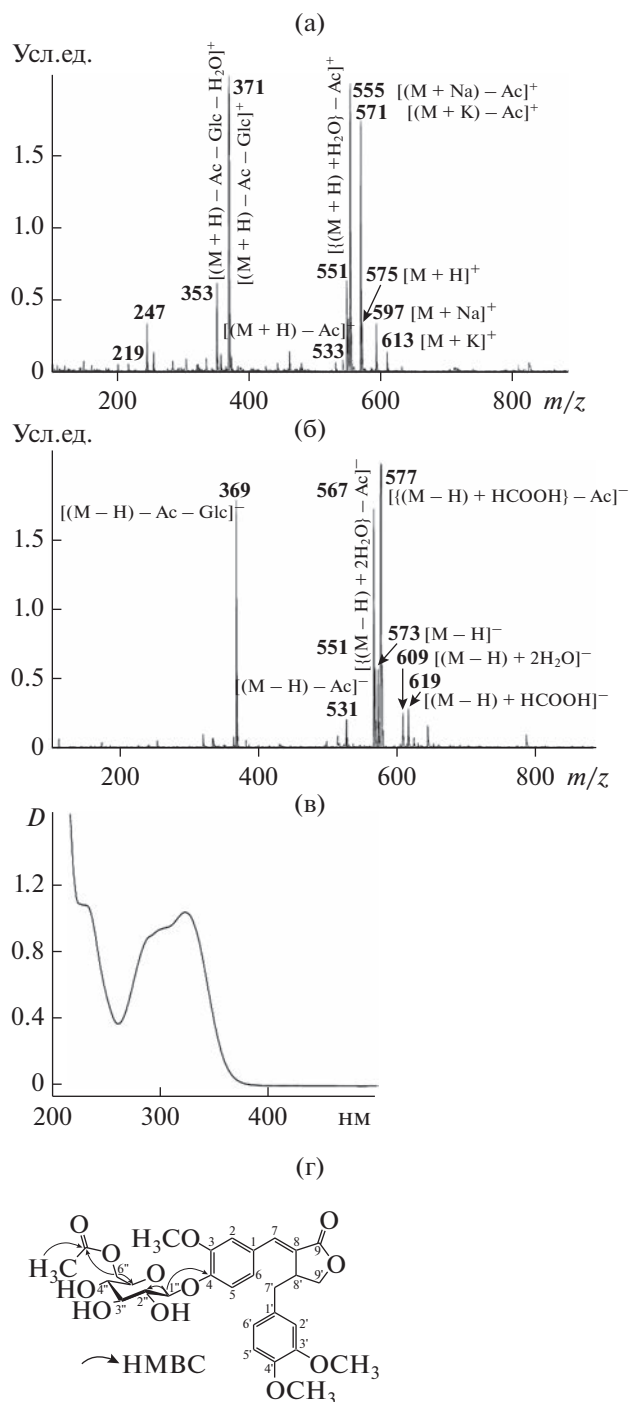


Рис. 3. Масс-спектры (а – положительная ионизация, б – отрицательная ионизация; Ac – ацетил, Glc – глюкоза), спектр поглощения (в) и структура (г) 6"-*O*-ацетил-картамозида (соединение 15).

гетероядерной многосвязной корреляционной спектроскопии НМВС ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3.40, 3.58/170.5). Таким образом, соединение 15 представляло собой картамогенин 4-*O*-(6"-*O*-ацетил)- β -D-глюкопиранозид или 6"-*O*-ацетил-картамозид (рис. 3г), являющийся новым природным соединением.

Таблица 3. Концентрация индивидуальных соединений в эндосперме и коже семян *R. uniflorum* и показатель ингибирования панкреатической α -амилазы человека (IC_{50})

Соединение	Концентрация, мг/г сухой массы		IC ₅₀ , мкг/мл
	в эндосперме	в коже	
Кофеилхинные кислоты			
4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	0.46 ± 0.01	<0.10	125.32 ± 3.70*
5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	1.48 ± 0.03	0.77 ± 0.02	67.11 ± 2.01*
3,4-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	0.57 ± 0.01	<0.10	61.02 ± 1.89*
3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	6.12 ± 0.12	4.01 ± 0.08	41.27 ± 1.19*
4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	0.26 ± 0.00	<0.10	26.84 ± 0.75*
Флавоноиды			
6-Гидроксилитеолин 7- <i>O</i> -глюкозид	3.05 ± 0.06	3.19 ± 0.07	28.14 ± 0.84*
Раунозид В	0.63 ± 0.01	2.39 ± 0.04	10.50 ± 0.30*
Литеолин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -кофеил)-глюкозид	0.71 ± 0.02	2.57 ± 0.05	14.83 ± 0.45*
Литеолин	< 0.10	1.07 ± 0.02	25.67 ± 0.77*
Лигнаны			
Трахелозид	5.48 ± 0.09	2.32 ± 0.04	>500
Картамозид	28.62 ± 0.65	3.41 ± 0.07	85.63 ± 2.09*
6"- <i>O</i> -Ацетил-картамозид	<0.10	<0.10	159.16 ± 4.77*
Картамогенин	0.75 ± 0.02	2.27 ± 0.04	30.32 ± 0.46*
Производные серотонина			
Изоферулоил-серотонин	<0.10	2.03 ± 0.03	50.02 ± 1.45*
Экдистероиды			
20-Гидроксиэкдизон	26.95 ± 0.56	6.12 ± 0.14	>500
2-Дезокси-20-гидроксиэкдизон	0.25 ± 0.00	<0.10	>500

* Отличия достоверны при $p < 0.05$ в сравнении с группой акарбозы ($IC_{50} = 57.34 \pm 1.61$ мкг/мл).

Сведения о количественном распределении отдельных соединений в частях семени *R. uniflorum* указывали на то, что для эндосперма характерно накопление кофеилхинных кислот (8.89 мг/г), лигнанов (34.85 мг/г) и экдистероидов (27.20 мг/г), в то время как в коже наблюдалось аккумуляция флавоноидов (9.78 мг/г) и производных серотонина (2.03 мг/г) (табл. 3). Ранее сходный характер распределения был выявлен в семенах *R. carthamoides*, для которых наибольшее содержание лигнанов трахелозида и картамозида было установлено в эндосперме, а ферулоил-серотонина – в коже семян [14].

Проведенные исследования биологической активности индивидуальных соединений из семян *R. uniflorum* показали, что наиболее эффективными ингибиторами панкреатической α -амилазы человека были раунозид В (IC_{50} 10.50 мкг/мл) и литеолин 7-*O*-(6"-*O*-кофеил)-глюкозид (IC_{50} 14.83 мкг/мл), активность которых была выше таковой акарбозы (табл. 3). Оба флавоноида содержали свободную орто-дигидроксигруппировку в кольце В агликаона и кофеильном фрагменте, что является структурным фактором, повышающим ингиби-

торное влияние соединений на α -амилазу [15]. Среди кофеилхинных кислот и лигнанов наибольшая эффективность была выявлена для 4,5-ди-*O*-кофеилхинной кислоты (IC_{50} 26.84 мкг/мл) и картамогенина (IC_{50} 30.32 мкг/мл).

Активность изоферулоил-серотонина была близка к таковой акарбозы, а экдистероиды и трахелозид слабо ингибировали активность α -амилазы поджелудочной железы человека ($IC_{50} > 500$ мкг/мл). Применение ВЭЖХ-микрофракционирования с последующим анализом активности полученных элюатов показало, что наибольший вклад в суммарную активность отвара семян *R. uniflorum* вносило присутствие картамозида, изоферулоил-серотонина, 3,5-ди-*O*-кофеилхинной кислоты, картамогенина и 5-*O*-кофеилхинной кислоты (до 86% от суммарной активности пробы), что обусловлено высоким содержанием указанных соединений в препарате (рис. 16).

С использованием теста на летальность с *Artemia salina* была определена токсичность выделенных соединений, составившая >1000 мкг/мл для всех веществ, что позволило предположить относительно высокую безопасность при их применении.

Научные сведения, касающиеся эффективности ингибирования α -амилазы фенольными соединениями растений, в большей своей части получены в результате использования ферментов бактериального (*Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*), грибного (*Aspergillus oryzae*) происхождения, а также α -амилазы поджелудочной железы свиньи и слюнной железы человека [2]. Эксперименты, проведенные с применением α -амилазы поджелудочной железы человека немногочисленны, однако известно, что бисдеметоксикуркумин [16], дегидродизвгенол В [17] и ругозин D [8] характеризуются наибольшей эффективностью ингибирования фермента со значениями IC_{50} 7.70, 9.68 и 30.84 мкг/мл соответственно. Однако, следует отметить, что токсичность куркуминоидов, производных эвгенола и эллаготаннинов группы ругозина, определенная методом с *Artemia salina*, составляла <1000 [18], <1 [19] и <100 мкг/мл [20] соответственно, что характеризовало эти соединения как более токсичные в сравнении с метаболитами семян *R. uniflorum*.

Проведенные исследования впервые показали, что водный отвар семян *R. uniflorum* является эффективным ингибитором панкреатической α -амилазы человека, что обусловлено высоким содержанием фенольных соединений различных структурных типов. Наибольшим ингибиторным действием обладали раунозид В, лютеолин 7-О-(6"-О-кофеил)-глюкозид, лютеолин, 4,5-ди-О-кофеилхинная кислота, 6-гидроксилуеолин 7-О-глюкозид и картамогенин, активность которых установлена впервые. Эти соединения могут быть использованы для создания новых потенциальных антидиабетических средств, получаемых из растений.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта № 121030100227-7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alam S., Sarker M.M.R., Sultana T.N., Chowdhury M.N.R., Rashid M.A., Chaity N.I. et al. // Front. Endocrinol. 2022. V. 13. № 800714. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.800714>
2. Sales P.M., Souza P.M., Simeoni L.A., Magalhães P.O., Silveira D. // J. Pharm. Pharm. Sci. 2009. V. 15. P. 141–183. <https://doi.org/10.18433/j35s3k>
3. Баторова С.М., Яковлев Г.П., Асеева Т.А. Справочник лекарственных растений традиционной тибетской медицины. Новосибирск: Наука, 2003. 291 с.
4. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Chem. Nat. Comp. 2019. V. 55. P. 256–264. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02662-2>
5. Olennikov D.N. // Chem. Nat. Comp. 2018. V. 54. P. 751–754. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2462-4>
6. Olennikov D.N. // Chem. Nat. Comp. 2019. V. 55. P. 157–159. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02642-6>
7. Shantanova L.N., Olennikov D.N., Matkhanov I.E., Gulyaev S.M., Toropova A.A., Nikolaeva I.G., Nikolaev S.M. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. № 1186. <https://doi.org/10.3390/ph14111186>
8. Olennikov D.N., Chemposov V.V., Chirikova N.K. // Plants. 2021. V. 10. № 2525. <https://doi.org/10.3390/plants10112525>
9. Harmatha J., Buděšínský M., Vokáč K., Pavlík M., Grüner K., Laudová V. // Collect. Czech. Chem. Commun. 2007. V. 72. P. 334–346. <https://doi.org/10.1135/cccc20070334>
10. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kashchenko N.I., Gornostai T.G., Selyutina I.Y., Zilfkarov I.N. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. № 2579. <https://doi.org/10.3390/ijms18122579>
11. Akabane M., Yamamoto A., Aizawa S., Taga A., Kodama S. // Analyt. Sci. 2014. V. 30. P. 739–743. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.739>
12. Olennikov D.N., Chirikova N.K. // Chem. Nat. Comp. 2019. V. 55. P. 1032–1038. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02887-1>
13. Olennikov D.N., Chirikova N.K., Kashchenko N.I., Nikolaev V.M., Kim S.-W., Vennos C. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. № 756. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00756>
14. Sólyomváry A., Mervai Z., Molnár-Perl I., Boldizsár I. // Nat. Prod. Res. 2014. V. 28. P. 732–739. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.879473>
15. Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2006. V. 52. P. 149–153. <https://doi.org/10.3177/jnsv.52.149>
16. Dandekar P.D., Kotmale A.S., Chavan S.R., Kadlag P.P., Sawant S.V., Dhavale D.D., Kumar A.R. // ACS Omega. 2021. V. 6. P. 1780–1786. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00617>
17. Ponnusamy S., Zinjarde S., Bhargava S., Rajamohan P.R., Ravikumar A. // Food Chem. 2012. V. 135. P. 2638–2642. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.110>
18. García A.L.L., Olaya M.Q.J.H., Sierra A.J.I. // Rev. Cubana Plant. Med. 2017. V. 22. P. 1–14.
19. Cansian R.L., Vanin A.B., Orlando T., Piazza S.P., Puton B.M.S., Cardoso R.I. et al. // Braz. J. Biol. 2017. V. 77. P. 155–161. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.12215>
20. Yamasaki T., Sato M., Mori T., Mohamed A.S.A., Fujii K., Tsukioka J. // J. Nat. Toxins. 2002. V. 11. P. 165–171.

New Inhibitors of Pancreatic α -amylase from *Rhaponticum uniflorum***D. N. Olennikov^{a, *} and N. I. Kashchenko^a**^a *Institute of General and Experimental Biology SD RAS, Ulan-Ude, 670047 Russia*^{*}*e-mail: olennikovdn@mail.ru*

The basic strategy for the treatment of diabetes mellitus is the control of postprandial glucose levels, and therefore pancreatic α -amylase that hydrolyzes complex carbohydrates is an important enzymatic target for the scientific research. In the present study, an aqueous extract and its ethyl acetate fraction (EAF) from the seeds of *Rhaponticum uniflorum* had a pronounced inhibitory effect on the activity of human pancreatic α -amylase. Sixteen metabolites were isolated after the chromatographic separation of EAF and characterized as 4-*O*-, 5-*O*-, 3,4-di-*O*-, 3,5-di-*O*-, 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 6-hydroxyluteolin 7-*O*-glucoside, rhaunoside B, luteolin 7-*O*-(6"-*O*-caffeoyl)-glucoside, luteolin, carthamoside, carthamogenin, tracheloside, isoferuloyl-serotonin, 20-hydroxyecdysone, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone and a new natural compound, which was carthamogenin 4-*O*-(6"-*O*-acetyl)- β -D-glucopyranoside (6"-*O*-acetyl-cartamoside). Quantitative HPLC data indicated a different distribution of the individual components between the endosperm and the seed coat. The study of the compounds effect on the activity of human pancreatic α -amylase showed that some flavonoids, caffeoylquinic acids, lignans and serotonin derivatives had a pronounced inhibitory effect. These results support the conclusion that *Rhaponticum uniflorum* seeds may be a useful natural source for the development of α -amylase inhibitory agents.

Keywords: *Rhaponticum uniflorum*, human pancreatic α -amylase inhibitors, phenolic compounds

УДК 577.15.08

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ НА МИКРОСФЕРАХ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

© 2023 г. П. Ю. Стадольникова¹ *, Б. Б. Тихонов¹, Е. А. Прутенская¹,
А. И. Сидоров¹, М. Г. Сульман¹

¹Тверской государственный технический университет, Тверь, 170026 Россия

*e-mail: p.stadolnikova@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2022 г.

После доработки 10.07.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Глюкозооксидаза из *Aspergillus niger* была иммобилизована посредством ковалентной сшивки на поверхности альгинатных микросфер, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования. Проведено сравнение каталитических свойств свободного и иммобилизованного фермента. Размер полученных микросфер составил менее 200 мкм. В инфракрасных Фурье-спектрах диффузионного отражения полупродуктов синтеза биокатализатора были выявлены пики, соответствующие образованным ковалентным связям между ферментом и носителем. Эксперименты показали, что иммобилизованный фермент имел активность на 40% ниже, чем свободная глюкозооксидаза, но при этом обладал активностью в более широком диапазоне температур. Кинетические параметры для нативной глюкозооксидазы: $V_{\max}$ – 0.341 ммоль/л·мин, K_m – 5.41 ммоль/л; для иммобилизованной – 0.203 ммоль/л·мин и 11.43 ммоль/л соответственно; биокатализатор теряет менее 25% активности за 5 циклов повторного использования. Синтезированный биокатализатор может быть использован в пищевой промышленности качестве хлебопекарного улучшителя, в химической и фармацевтической промышленности для получения глюконовой кислоты, а также в аналитической химии для определения концентрации глюкозы.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, иммобилизация, альгинат натрия, биополимеры, альгинатные микросферы, эмульгирование, внутреннее гелеобразование

DOI: 10.31857/S0555109923010129, **EDN:** CVHSNC

Глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4, D-глюкозо-1-оксидаза, GOX) – димерный флавопротеин, относящийся к семейству глюкоза-метанол-холин оксидоредуктаз [1]. Основная роль – участие в метаболизме глюкозы в клетках. Глюкозооксидазу можно получить из большого числа природных источников – водорослей, растений, животных, насекомых, бактерий и грибов, однако наиболее широко используемыми промышленными продуцентами глюкозооксидазы являются мицелиальные грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* [2].

Глюкозооксидаза, выделенная из аскомицетов, представляет собой гликопротеин, состоящий из 2 идентичных полипептидных цепей, ковалентно связанных между собой дисульфидными связями [3]. Фермент содержит 2 молекулы флавинадениндинуклеотида (ФАД) в качестве кофермента, по одной на каждую субъединицу белковой молекулы, нековалентно связанных с активным центром [4]. Гликозилированные глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* и *Penicillium amagasakiense* представляют собой несколько вытянутые глобулярные белки с молекулярной массой 150–160 кДа со степенью

гликозилирования 10–16%. Температурный оптимум грибных глюкозооксидаз находится в пределах 40–60°C, оптимум pH – 4.0–7.0, изоэлектрическая точка в пределах pH 4.0–5.0 [5]. Глюкозооксидаза катализирует окисление β-D-глюкозы по C-1 связи до D-глюконо-δ-лактона (δ-глюконо-1,5-лактона) с образованием пероксида водорода H₂O₂ с использованием молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов [3].

В последние десятилетия глюкозооксидаза широко применяется в различных отраслях промышленности и науки: в медицинской диагностике и фармацевтической, химической, текстильной и пищевой сферах, а также в охране окружающей среды и в биоэнергетике [2, 4]. В том числе, глюкозооксидаза широко используется в составе аналитических систем и биосенсоров для определения содержания глюкозы в крови, сыворотке и плазме, в органическом синтезе для коммерческого получения глюконовой кислоты, применяемой в качестве пищевой добавки и компонента лекарственных средств [6]. Также глюкозооксидаза может использоваться в качестве хлебопе-

карных улучшителей [7]. При этом во многих процессах целесообразнее использовать иммобилизованные формы глюкозооксидазы, что позволяет существенно повысить ее устойчивость к ингибирующим воздействиям, а также обеспечить возможность многократного использования фермента [8]. Опубликован целый ряд работ, описывающих успешный опыт иммобилизации глюкозооксидазы на различных твердых носителях [6].

Среди наиболее перспективных матриц для иммобилизации глюкозооксидазы выделяют биополимеры, синтезированные живыми организмами, или синтезированные химическим путем из биологических материалов. Их преимущества — разнообразие структурного состава, специфические физико-химические свойства, широкая доступность в природе, невысокая стоимость и возобновляемый характер, что делает их особенно привлекательными для пищевой, биомедицинской и фармацевтической промышленности [9]. В частности, Донг с соавт. иммобилизовали глюкозооксидазу на модифицированном L-лизинном хитозане, что существенно повысило операционную стабильность и термоустойчивость фермента [10]. Танг с соавт. иммобилизовали глюкозооксидазу на частицах хитозан-триполифосфат натрия и использовали ее для улучшения хлебопекарных свойств пшеничной муки [11].

Биополимеры используются в различных формах — пленки, мембраны, волокна, гидрогели, оболочки, нано- и микрочастицы, губки и аэрогели [12]. Особый интерес представляют микрочастицы (микросферы) альгината натрия, благодаря своему размерному диапазону (1–1000 мкм), а также неоспоримым преимуществам самого альгината, таким как дешевизна, нетоксичность, биосовместимость, биоразлагаемость [13, 14] и способность водного раствора полимера к ионному гелеобразованию в присутствии двухвалентных катионов (прежде всего — кальция) [15]. Альгинат — анионный полисахарид, имеющий реакционноспособные карбоксильные группы [16], что предоставляет возможность модификации носителя с помощью функциональных реагентов для проведения эффективной иммобилизации.

Микрочастицы альгината имеют перспективы применения в различных отраслях. В фармацевтической промышленности альгинатные микрошарики представляют собой пример многокомпонентных систем доставки, предназначенных для достижения пролонгированной или контролируемой доставки лекарственных средств [17]. Микрочастицы альгината используются также в качестве матрицы для иммобилизации различных ферментов [18, 19], перспективны в сельскохозяйственных приложениях [20] и в вопросах охраны окружающей среды и ремедиации [21].

Среди существующих методов получения альгинатных микросфер широкое распространение получила техника эмульгирования/гелеобразования, которая позволяет изготавливать микросферы в микромасштабе (диаметр частиц менее 100 мкм), имеет низкую стоимость и несложное экспериментальное оборудование [14]. Стандартное исполнение метода включает в себя два этапа: образование стабильных полимерных капель в эмульсионной системе “вода-в-масле” и последующая ионотропная сшивка этих капель посредством взаимодействия с ионами сшивающего агента [22]. В рамках метода эмульгирования для формирования гидрофобной фазы при получении эмульсий возможно использование различных масел: парафинового [23], рапсового [24], соевого [25], подсолнечного [26]. Использование растительных масел является более предпочтительным, так как минеральные масла могут представлять потенциально большую опасность для окружающей среды, а также их использование может приводить к увеличению диаметра альгинатных микросфер и затруднять дальнейший их переход из масляной фазы в водную [27, 28]. Следует отметить, что на размер и однородность микросфер решающее влияние оказывает баланс между дисперсионными силами и поверхностным натяжением, который определяет размер эмульсионных капель [29]. Ключевую роль в этом играют сурфактанты, снижающие межфазное натяжение между гидрофильной и гидрофобной фазами, приводя к образованию стабильных эмульсий, уменьшая размер эмульсионных капель и предотвращая их коалесценцию для получения дискретных микрочастиц [14]. В эмульсификационном методе получения альгинатных микросфер используются неионогенные поверхностно-активные вещества (например, из группы Span и Tween) [30], имеющие определенные преимущества перед ионными ПАВ, а именно менее выраженное взаимодействие с двухвалентными ионами и высокую растворимость в масляных средах, что используется для очистки и извлечения альгинатных частиц [31].

Как уже было указано выше, альгинат образует стойкие гидрогели в мягких условиях и в присутствии двухвалентных катионов [32]. Гелеобразование может быть двух типов: внутреннее и внешнее. При внешнем гелеобразовании ионы сшивающего агента диффундируют из внешней непрерывной фазы внутрь полимерных капель, тогда как при внутреннем гелеобразовании полимерные капли уже содержат сшивающий агент в недиссоциированной форме, а инициаторы гелеобразования (например, ионы H^+) диффундируют в капли из внешней фазы и вызывают высвобождение сшивающего агента и последующее гелеобразование [33]. В частности, Ванг с соавт. [34] провели успешную иммобилизацию глюкозооксидазы на поверхности твердых альгинатных микросфер,

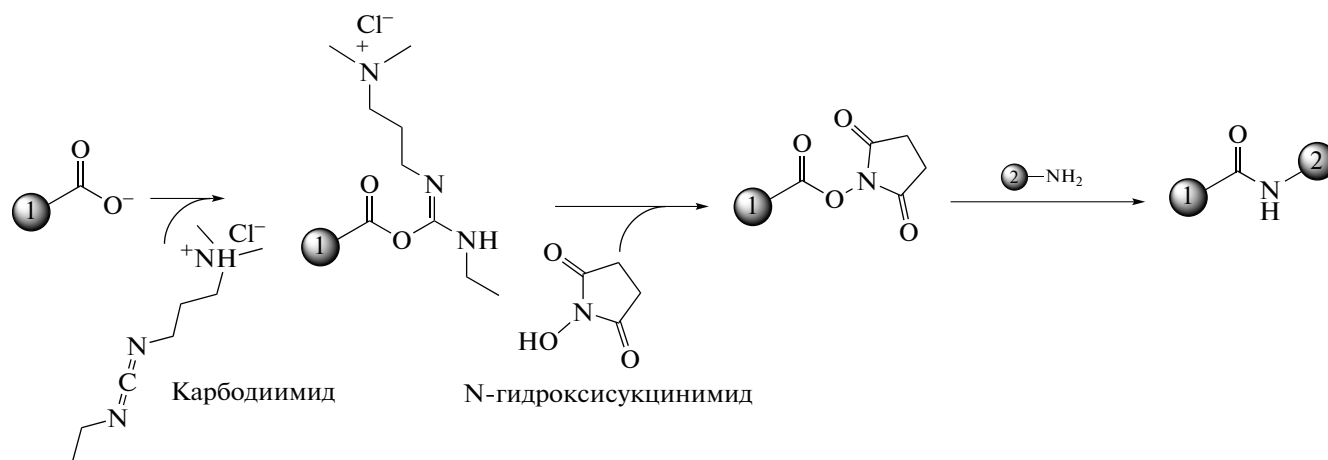


Рис. 1. Схема активации карбоксильных групп альгината натрия карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом: 1 — альгинатные микросферы; 2 — глюкозооксидаза.

полученных методом эмульгирования, и с последующим их покрытием 1%-ным (масс./об.) хитозаном с сохранением 83% активности фермента.

Цель работы — создать многокомпонентную биокаталитическую систему на основе глюкозооксидазы, ковалентно иммобилизованной на микросферах из альгината натрия, полученных методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, и исследовать ее физико-химические и каталитические свойства.

МЕТОДИКА

Реактивы и оборудование. В работе использовали альгинат натрия, D-глюкозу, ледяную уксусную кислоту, растворимый крахмал Линтнера производства “Химмедсервис” (Россия), карбонат кальция, йодид калия, молибдат аммония — “Реахим” (Россия), масло подсолнечное рафинированное дезодорированное “Каждый день” (“Аквилон”, Россия), Span 80, кумасси бриллиантовый синий G-250 (“Sigma-Aldrich”, США), Tween 80 (“PanReac”, Германия), N-гидроксисукцинимид (“Acros Organics”, Бельгия), N-(3-диметиламинопропил)-N'-этил-карбодиимид гидрохлорид (далее — “карбодиимид”, “Fluka”, Япония), пероксид водорода (“Росбио”, Россия).

Для микроскопирования микросфер использовали микроскоп Inskam-315 (“Inskam”, Китай) с цифровой камерой (12 мегапикселей, внешний экран 7 дюймов) и оптический микроскоп XSZ-107 (“Армед”, Россия). Размер микрочастиц и кластеров оценивался с помощью размерной сетки камеры Горяева. Для измерения оптической плотности реакционной смеси использовали спектрофотометр СФ-2000 (“Спектр”, Россия).

Получение микросфер альгината методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования. К

0.08 г микрокристаллического порошка карбоната кальция CaCO_3 добавляли 20 мл 1.5%-ного раствора альгината натрия при постоянном перемешивании. Полученную суспензию диспергировали в 40 мл подсолнечного масла, содержащего Span 80 (2 об. %) и интенсивно перемешивали в течение 2 мин. После эмульгирования в смесь добавляли 30 мл подсолнечного масла, содержащего 2% (об.) Span 80 и 0.2 мл ледяной уксусной кислоты. Интенсивное перемешивание продолжали в течение 10 мин. Далее в смесь добавляли 150 мл дистиллированной воды, перемешивание продолжали при умеренной интенсивности в течение 30 мин. Для отделения образовавшихся гелевых кальций-альгинатных шариков от масляной фазы добавляли 250 мл осаждающего раствора 0.05 М хлорида кальция, содержащего 1% (об.) твин 80. Полученные микросферы осаждали из масляной фазы, которая удалялась из системы декантацией. Далее осадок альгинатных микросфер промывали 0.05 М раствором хлорида кальция, содержащего 1% (об.) твин 80. Микрочастицы отмывали несколько раз водой до полного удаления следов масла, наблюдаемых в поле оптического микроскопа.

Иммобилизация глюкозооксидазы. Полученные альгинатные микросферы выдерживали в течение 12 ч в 50 мл раствора, содержащего 0.394 г карбодиимида и 0.144 г N-гидроксисукцинимид. Схема активации карбоксильных групп альгината натрия карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом представлена на рис. 1.

Полученные микрочастицы промывали дистиллированной водой, выдерживали в течение 6 ч в растворе глюкозооксидазы (25 мг в 50 мл фосфатного буферного раствора с pH 6.0) и снова промывали дистиллированной водой. Иммобилизованный фермент хранили до проведения

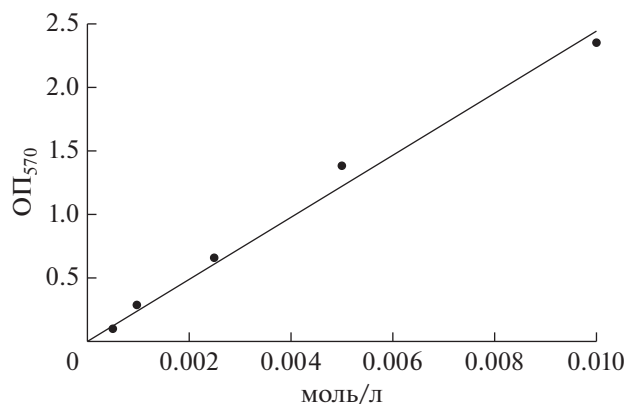


Рис. 2. Калибровочный график для определения концентрации пероксида водорода ($C_{\text{пер}}$).

экспериментов в холодильнике при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Окрашивание красителем кумасси бриллиантовый синий G-250. Визуализация распределения иммобилизованного фермента на поверхности микрочастиц проводили окрашиванием полученной системы реактивом Брэдфорда — кумасси бриллиантовый синий G-250. 0.5 мл раствора, содержащего микросферы, смешивали с 0.5 мл реактива, оставляли на 5 мин до развития синей окраски, после чего проводили микроскопирование для обнаружения окрашенных комплексов фермента с красителем.

Определение ферментативной активности. Для определения активности микросферы с нанесенной глюкозооксидазой смешивали с 40 мл раствора глюкозы (2.2 мМ) и проводили реакцию окисления при постоянном перемешивании и температуре 25°C в течение 60 мин с периодическим отбором пробы из реакционной смеси. Активность глюкозооксидазы оценивали по концентрации пероксида водорода в реакционной смеси, которую определяли по реакции пероксида водорода с йодидом калия в кислой среде и фотометрировании образующегося синего комплекса йод-крахмал [35]. В кювету спектрофотометра СФ-2000 вносили микропипеткой 10 мкл реакционной смеси, после чего строго последовательно добавляли 2.0 мл раствора HCl (0.05 н.), 0.2 мл раствора KI (16.6 мас. %), 0.2 мл раствора молибдата аммония (0.12 мас. %), 0.2 мл раствора крахмала Линтнера (5%) и через 3 мин измеряли оптическую плотность (ОП) смеси относительно дистиллированной воды при длине волны 570 нм. Калибровочный график строили по стандартным растворам H_2O_2 (рис. 2).

Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов рассчитывали по результатам реакций, проведенных при различных начальных концентрациях глюкозы с помощью линеариза-

ции уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка.

За 1 ед. активности биокатализатора принимали такое его количество, которое катализирует окисление 1 мкмоль субстрата в 1 мин при оптимальных условиях.

Для определения зависимости активности свободной и иммобилизованной глюкозооксидазы от значения pH реакционной среды раствор глюкозы готовился в буферных растворах с различными значениями pH. Определение зависимости активности свободной и иммобилизованной глюкозооксидазы от температуры реакционной среды проводилось в термостатируемом стеклянном реакторе.

Каждый из экспериментов проводили в трех повторностях. На графиках и в таблице представлены средние величины.

Инфракрасная Фурье-спектроскопия. Анализ инфракрасных спектров образцов проводился с помощью инфракрасного спектрофотометра с преобразованием Фурье и приставкой диффузионного отражения IRPrestige-21 (“Shimadzu”, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика кальций-альгинатных микросфер с иммобилизованной глюкозооксидазой. Влажные кальций-альгинатные шарики — микрочастицы преимущественно сферической формы, с просматривающимися воздушными полостями внутри полимерного тела матрицы (рис. 3). Такая структура может быть объяснена типом гелеобразования, используемого в работе: ионы кальция в виде нерастворимой соли, заключенные внутри альгинатных капелек, высвобождаются посредством снижения значений pH, что вызывает разложение карбоната кальция с образованием углекислого газа, воды и катионов Ca^{2+} , сшивающихся с альгинатным полимером изнутри, поэтому данный механизм гелеобразования получил название внутреннего [33, 36]. Получаемые этим методом микросферы часто мягкие и имеют тенденцию к высокой агломерации вследствие слабого гелеобразования [37], а выделение углекислого газа способствует образованию внутренних полостей в структуре гелевой матрицы [33], что подтверждают результаты исследования микрочастиц, полученные в работе.

Известно, что кумасси бриллиантовый синий G-250, связываясь с аминокислотными остатками белков, в частности с аргинином и лизином, образует с ними окрашенный синий комплекс, что позволяет обнаруживать белки с высокой точностью вплоть до 1 мкг [38]. Для идентификации иммобилизованного фермента на поверхности полученных микросфер было проведено окраши-

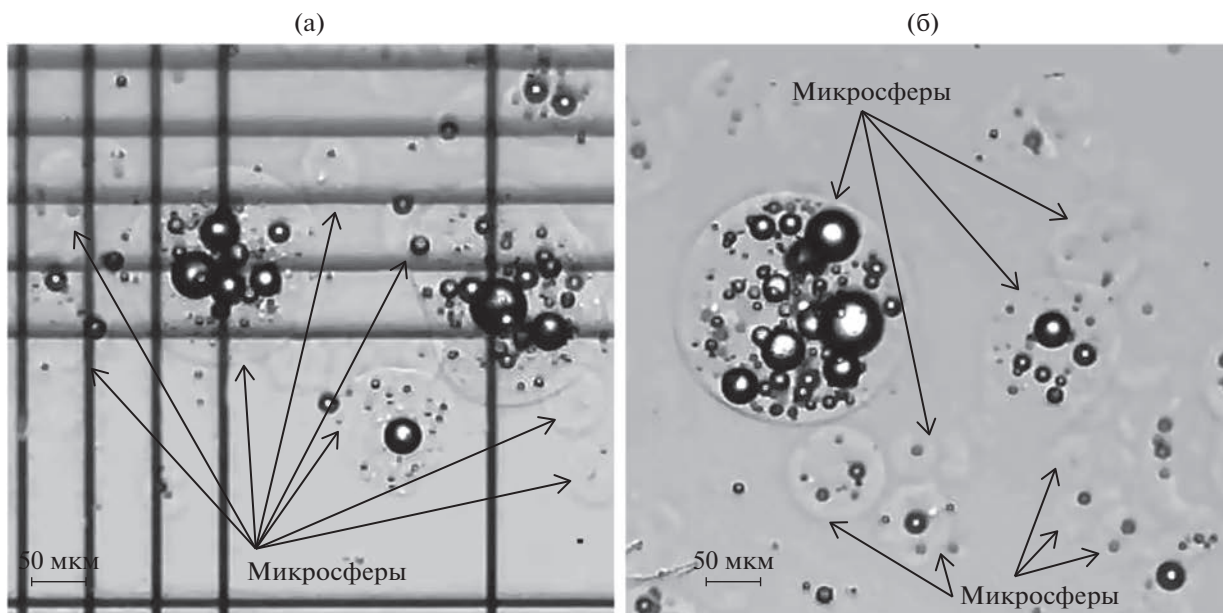


Рис. 3. Микрочастицы альгината, полученные методом эмульсификации/внутреннего гелеобразования, с иммобилизованной глюкозооксидазой: а – кальций-альгинатные микросферы внутри размерной сетки камеры Горяева (сторона малого квадрата 0.05 ± 0.001 мм); б – кальций-альгинатные микросферы, образующие скопления.

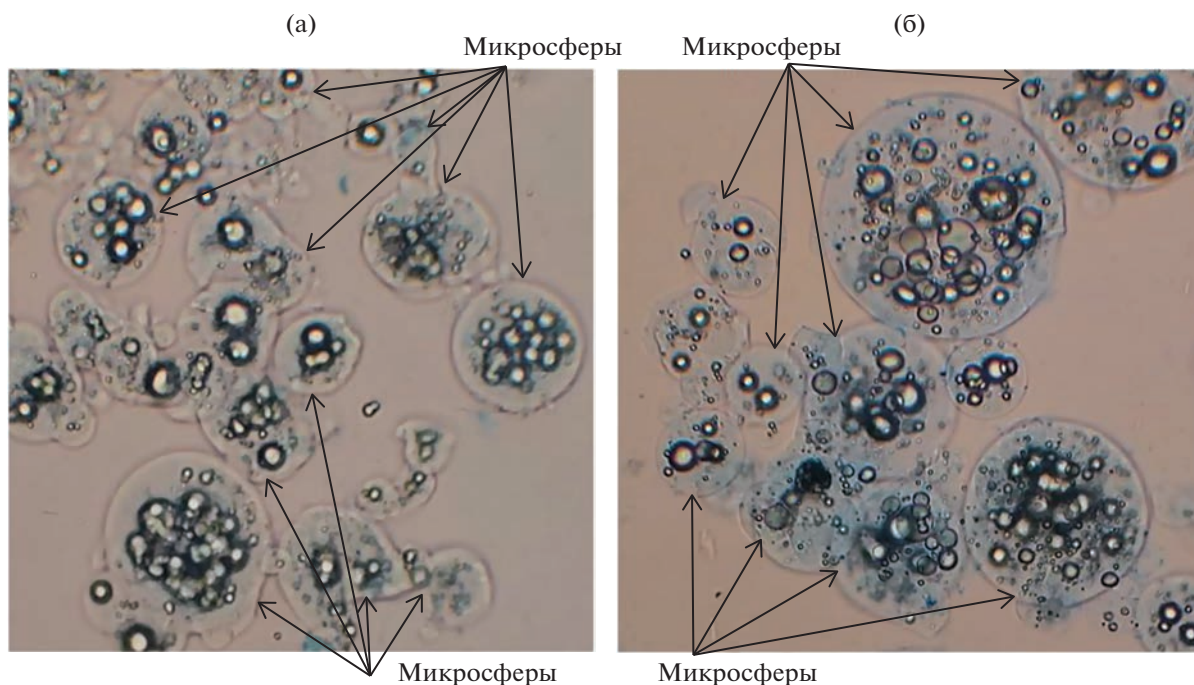


Рис. 4. Частицы многокомпонентной системы, окрашенные реактивом Брэдфорда (увеличение 160 $\times$): а – кальций-альгинатные микросферы без фермента; б – кальций-альгинатные микросферы с иммобилизованным ферментом, образующим синий комплекс с азокрасителем кумасси бриллиантовый синий G-250.

вание кумасси G-250 с последующим микроскопированием образцов. Полученные результаты представлены на рис. 4. На фотографиях отчетливо видна синяя окраска микросфер с иммобили-

зованной глюкозооксидазой, образующей комплекс с азокрасителем.

Полученные в данной работе микросферы альгината имели в диаметре до 200 мкм. Наблю-

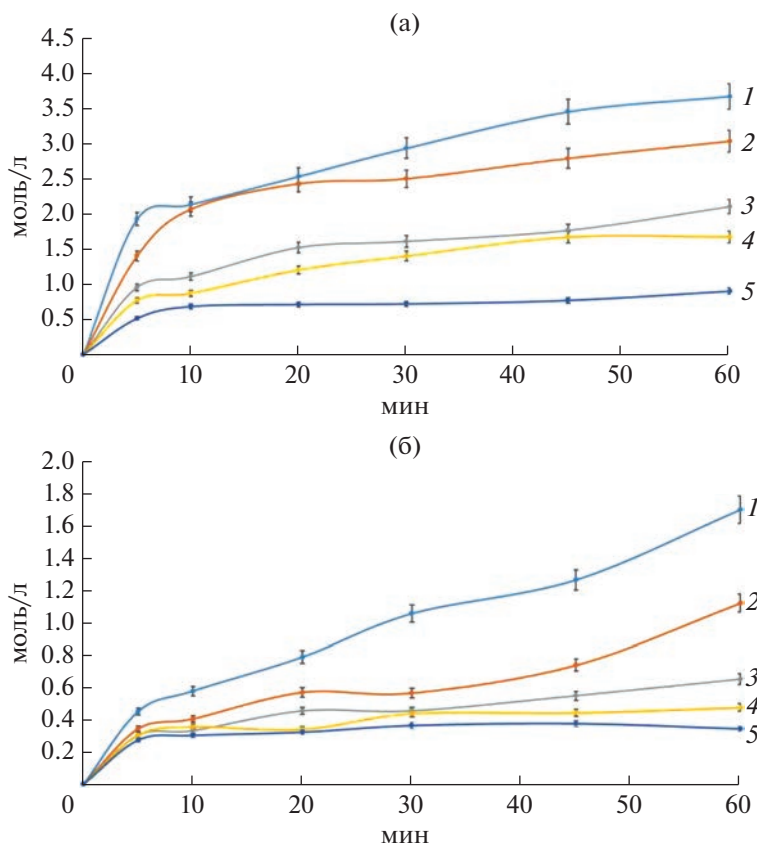


Рис. 5. Кривые реакции окисления различных концентраций (1–5) глюкозы свободной (а) и иммобилизованной (б) формой глюкозооксидазы: 1 – 22; 2 – 16; 3 – 11; 4 – 5.5; 5 – 2.2 мМ.

даемая размерная неоднородность микрочастиц объяснялась особенностью метода эмульгирования/гелеобразования: случайная коалесценция полимерных капель в эмульсии “вода-в-масле” может приводить к получению частиц, различающихся по размерам и формам [39], однако улучшенный физико-химический контроль позволяет уменьшить полидисперсность получаемых микросфер [40]. В зависимости от конкретных требований к частицам, эмульсификационный метод позволяет получать конкретный размер альгинатных частиц [14].

Определение активности свободного и иммобилизованного фермента. Протекание реакции в виде изменения концентрации образующегося пероксида водорода во времени для свободной формы глюкозооксидазы при варьировании начальной концентрации глюкозы представлен на рис. 5а, для иммобилизованной на альгинатных микросферах – на рис. 5б.

Из рис. 5б видно, что иммобилизованный препарат глюкозооксидазы обладал гораздо меньшей активностью по сравнению с ее свободной формой, что связано прежде всего с гетерогенизацией процесса вследствие иммобилизации фермента

на нерастворимом носителе, появлением диффузионных ограничений, а также с потерями фермента во время иммобилизации. Однако иммобилизация позволяет легко отделить фермент от реакционной смеси и получать более чистый продукт, а также многократно использовать фермент, что компенсирует потерю активности при однократном использовании.

Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов, рассчитанные линейризацией уравнения Михаэлиса–Ментен в координатах Лайнуивера–Берка, приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, K_m для иммобилизованной глюкозооксидазы выше, а V_{max} – ниже, что связано с потерями фермента при синтезе биокатализатора, уменьшением сродства фермента к субстрату, а также затруднением доступа субстрата к активным центрам фермента.

Кроме того, как показали эксперименты, иммобилизация на альгинатных микросферах несколько расширила диапазон температур и значений pH действия, по сравнению с растворимой формой фермента, что свидетельствовало о более высокой устойчивости синтезированных биокатализаторов к ингибирующим воздействиям (рис. 6).

Таблица 1. Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов*

Глюкозооксидаза	Активность, ед. $\times 10^3$ *	K_m , ммоль/л*	V_{max} , ммоль/л мин*
Свободная	5.46 ± 0.10	5.41 ± 0.10	0.341 ± 0.005
Иммобилизованная на альгинатных микросферах	3.25 ± 0.10	11.43 ± 0.10	0.203 ± 0.005

* Указаны средние значения и стандартные отклонения для серии из трех независимых экспериментов.

Как видно из рис. 6, pH-оптимум иммобилизованной на микросферах глюкозооксидазы не отличался от свободного фермента, при этом фермент проявлял несколько большую активность при других значениях pH.

Иммобилизованная глюкозооксидаза проявляла максимальную активность в значительно более широком диапазоне температур от 30 до 50°C, тогда как свободный фермент — ~30°C.

Проведенные эксперименты по многократному использованию биокатализатора показали, что он теряет менее 25% активности за 5 циклов при температурах от 30 до 50°C.

Инфракрасная Фурье-спектроскопия. Изучение полупродуктов синтеза биокатализатора методом инфракрасной Фурье-спектроскопии (рис. 7) показало, что в спектре альгинатных микросфер обнаружены полосы поглощения 2925 см^{-1} (CH); 1638 см^{-1} (=CO); 1409 см^{-1} (—C—O—C—), валентных колебаний пиранозного кольца 809 см^{-1} ; интенсивные полосы 1605–1608 и 1412–1413 см^{-1} , обусловленные асимметричными и симметричными валентными колебаниями карбонильной группы.

В спектре альгинатных микросфер, активированных карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом, выявлена полоса поглощения эфира N-ацилмочевины (полоса Амид II, 1660 см^{-1}), которая отсутствовала в предыдущем спектре, что свидетельствовало об эффективной активации свободных карбоксильных групп альгината для последующей иммобилизации. В спектре синтезированного биокатализатора выявлены полосы поглощения амидной связи — 1650, 1550 см^{-1} , что подтверждало образование ковалентной связи между активированными карбоксильными группами альгината натрия с аминок группами глюкозооксидазы.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что альгинатные микросферы, полученные методом эмульгирования/внутреннего гелеобразования, являются перспективным носителем для химической иммобилизации глюкозооксидазы. Наличие у биополимера свободных карбоксильных групп позволило провести активацию носителя карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом для последующей ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы в мягких условиях, обеспечивая прочное связывание фермента

посредством амидных связей с поверхностью микросфер. Использование данного носителя позволило повысить устойчивость фермента к ингибирующим воздействиям среды (pH, температура) и многократно использовать фермент. Таким образом, альгинатные частицы, получаемые в микродиапазоне размеров, на основе доступного, безопасного и биodeградируемого биополимера, могут служить носителем для ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы для создания многокомпонентных биокаталитических систем с перспективой применения в пищевой промышленности в качестве хлебопекарных улучшителей, в химической и фармацевтической промышленно-

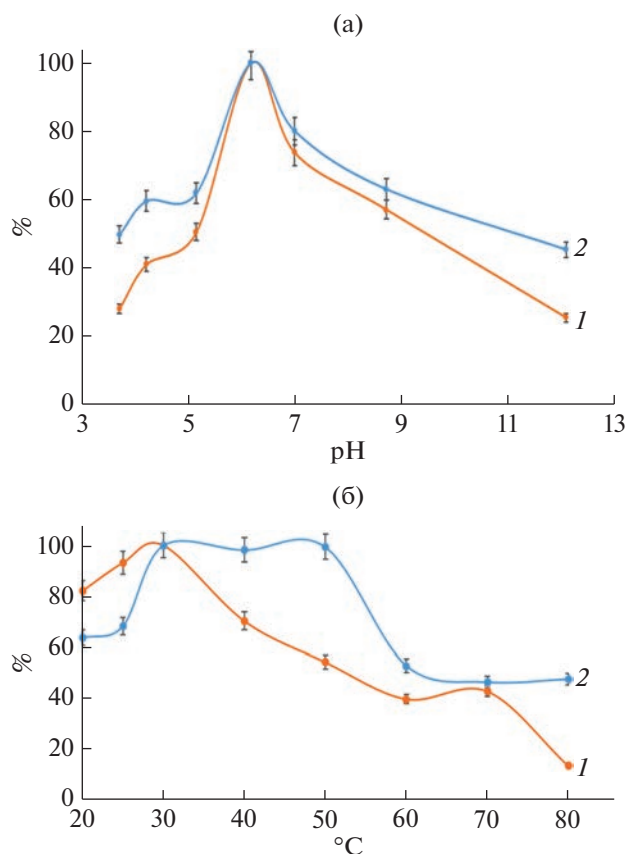


Рис. 6. Зависимость активности свободной (1) и иммобилизованной (2) глюкозооксидазы от значения pH реакционной среды (а) и температуры (б).

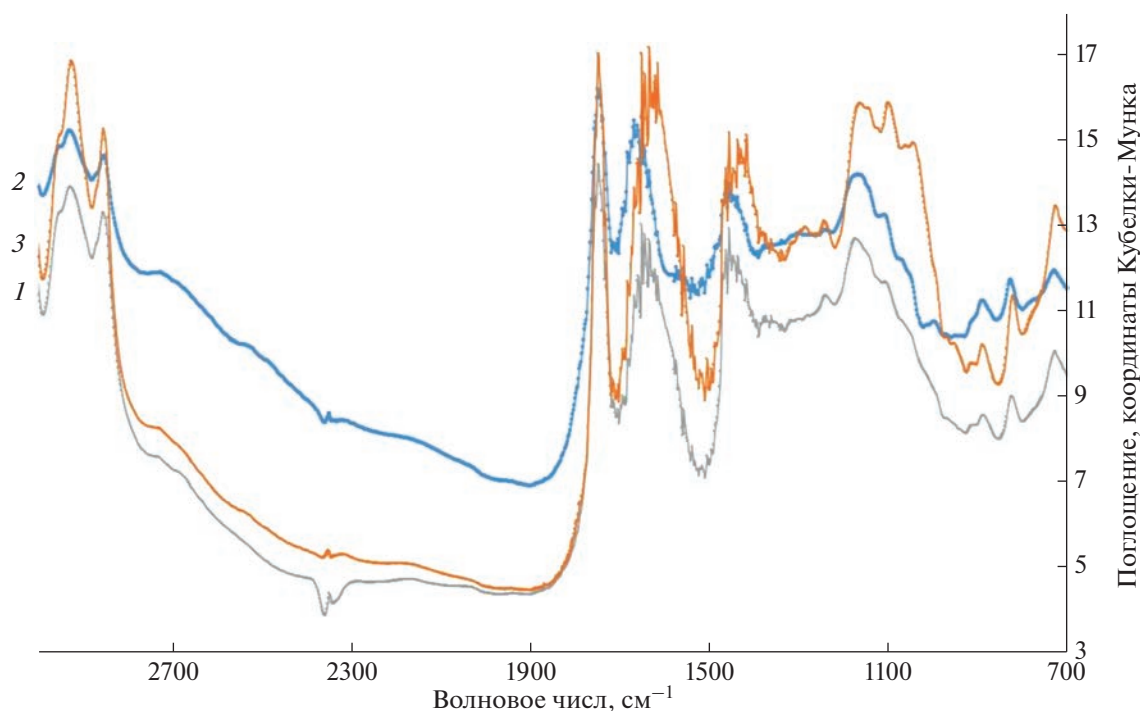


Рис. 7. Инфракрасные Фурье-спектры полупродуктов синтеза биокатализатора: 1 – альгинатные микросферы; 2 – альгинатные микросферы, активированные карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом; 3 – альгинатные микросферы, активированные карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом, с нанесенной глюкозооксидазой.

сти для получения глюконовой кислоты и в аналитической химии для определения концентрации глюкозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferri S., Kojima K., Sode K. // J. Diabetes Sci. Technol. 2011. V. 5. № 5. P. 1068–1076.
2. Dubey M.K., Zehra A., Aamir M., Meena M., Ahirwal L., Singh S. et al. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 1–22.
3. Wilson R., Turner A.P.F. // Biosens. Bioelectron. 1992. V. 7. P. 165–185.
4. Bankar S.B., Bule M.V., Singhal R.S., Ananthanarayan L. // Biotechnol. Advances. 2009. V. 27. № 4. P. 489–501.
5. Kornecki J.F., Carballares D., Tardioli P.W., Rodrigues R.C., Berenguer-Murcia Á. et al. // Catal. Sci. Technol. 2020. V. 10. P. 5740–5771.
6. Tikhonov B., Sulman E., Stadol'nikova P., Sulman A., Golikova E., Sidorov A., Matveeva V. // Catal. Ind. 2019. V. 11. P. 251–263.
7. Dagdelen A.F., Gocmen D. // J. Food Qual. 2007. V. 30. P. 1009–1022.
8. Schmidt A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolds M., Witholt B. // Nature. 2001. V. 409. P. 258–268.
9. Smith A.M., Moxon S., Morris G.A. Wound Healing Biomaterials: Vol. Two, Functional Biomaterials. Biopolymers as wound healing materials / Ed. Magnus S. Ågren. Woodhead Publishing, 2016. P. 261–287.
10. Dong L. C., Wang G., Xiao Y., Xu Y., Zhou X., Jiang H., Luo Q. // Chem. Biochem. Eng. Q. 2011. V. 25. № 3. P. 395–402.
11. Tang L., Yang R., Hua X., Yu C., Zhang W., Zhao W. // Food Chem. 2014. V. 161. P. 1–7.
12. Gheorghita R., Anchidin-Norocel L., Filip R., Dimian M., Covasa M. // Polymers. 2021. V. 13. P. 1–33.
13. Ching S.H., Bansal N., Bhandari B. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017. V. 57. № 6. P. 1133–1152.
14. Uyen N.T.T., Hamid Z.A.A., Tram N.X.T., Ahmad N.B. // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 153. P. 1–34.
15. Dhamecha D., Movsas R., Sano U., Menon J.U. // Int. J. Pharm. 2019. V. 569. P. 1–13.
16. Alnoch R.C., Santos L.A., Almeida J.M., Krieger N., Mateo C. // Catalysts. 2020. V. 10. № 6. P. 1–29.
17. Viscusi G., Gorrasi G. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 184. P. 271–281.
18. Liu Q., Rauth A.M., Wu X.Y. // Int. J. Pharm. 2007. V. 339. P. 148–156.
19. Arisanti C.I.S., Rachmawati H., Pamudji J.S., Sumirtapura Y.C. // J. Pharm. Sci. App. 2012. V. 1. № 1. P. 47–61.
20. Juric S., Dermic E., Topolovec-Pintaric S., Bedek M., Vincekovic M. // J. Integr. Agric. 2019. V. 18. № 11. P. 2534–2548.
21. Üçüncü T.E., Terzioğlu K., Türe H. // Chem. Ecol. 2017. V. 33. № 7. P. 652–668.
22. Liu L., Wu F., Ju X.-J., Xie R., Wang W., Niu C.H., Chu L.-Y. // J. Colloid Interf. Sci. 2013. V. 404. P. 85–90.
23. Uyen N.T.T., Hamid Z.A.A., Nurazreena A. // Mater. Today: Proc. 2019. V. 17. P. 792–797.

24. Börner R.A., Aliaga M.T.A., Mattiasson B. // *Biotechnol. Lett.* 2013. V. 35(3). P. 397–405.
25. Cai S., Zhao M., Fang Y., Nishinari K., Phillips G.O., Jiang F. // *Food Hydrocoll.* 2014. V. 39. P. 295–300.
26. Kim E.S., Lee J.-S., Lee H.G. // *Food Sci. Biotechnol.* 2016. V. 25(5). P. 1337–1343.
27. Poncelet D., Lencki R., Beaulieu C., Halle J.P., Neufeld R.J., Fournier A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992. V. 38. P. 39–45.
28. Reis C.P., Neufeld R.J., Vilela S., Ribeiro A.J., Veiga F. // *J. Microencapsul.* 2006. V. 23(3). P. 245–257.
29. Silva C.M., Ribeiro A.J., Figueiredo M., Ferreira D., Veiga F. // *AAPS J.* 2006. V. 7(4). P. 903–913.
30. Ching S.H., Bansal N., Bhandari B. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2017. V. 57. № 6. P. 1133–1152.
31. Machado A.H.E., Lundberg D., Ribeiro A.J., Veiga F.J., Lindman B., Miguel M.G., Olsson U. // *Langmuir.* 2012. V. 28 № 9. P. 4131–4141.
32. Zhang Z., Ortiz O., Goyal R., Kohn J. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. Part 4: Polymeric Biomaterials. / Ed. K. Modjarrad, S. Ebnesajjad. William Andrew, 2014. P. 303–335.
33. Leong J.-Y., Lam W.-H., Ho K.-W., Voo W.-P., Lee M.F.-X., Lim H.-P. et al. // *Particuology.* 2016. V. 24. P. 44–60.
34. Wang X., Zhu K.-X., Zhou H.-M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. № 5. P. 3042–3054.
35. Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман М.Г. // *Вестник ТвГУ. Серия: Химия.* 2021. № 2(44). С. 18–25.
36. Song H., Yu W., Gao M., Liu X., Ma X. // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 96. № 1. P. 181–189.
37. Mark D., Haeberle S., Zengerle R., Ducree J., Vladislavjevic G.T. // *J. Colloid Interf. Sci.* 2009. V. 336. № 2. P. 634–641.
38. *The Protein Protocols Handbook: Second Edition* / Ed. John M. Walker. Humana Press Inc., 2002. 1147 p.
39. Zhao Y., Teresa Carvajal M., Won Y.-Y., Harris. M.T. // *Langmuir.* 2007. V. 23. № 25. P. 12489–12496.
40. Poncelet D., Poncelet De Smet B., Beaulieu C., Huguet M.L., Fournier A., Neufeld R.J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. V. 43. P. 644–650.

Immobilization of Glucose Oxidase on Sodium Alginate Microspheres

P. Yu. Stadolnikova^{a,*}, B. B. Tikhonov^a, E. A. Prutenskaya^a, A. I. Sidorov^a, and M. G. Sulman^a

^a Tver State Technical University, Tver, 170026 Russia

*e-mail: p.stadolnikova@mail.ru

Glucose oxidase from *Aspergillus niger* was immobilized by covalent cross-linking on the surface of alginate microspheres obtained by emulsification/internal gelation method. The catalytic properties of the free and immobilized enzyme were compared. The size of the resulting microspheres was less than 200 μm. Experiments have shown that the immobilized enzyme has an activity 40% lower than the free glucose oxidase, but it has a high activity in a wider range of temperatures and pH values. Kinetic parameters for native glucose oxidase: limit reaction rate – 0.341 mM · min⁻¹, Michaelis constant – 5.41 mM; for immobilized: limit reaction rate – 0.203 mM · min⁻¹, Michaelis constant – 11.43 mM. In infrared Fourier spectra of diffusion reflection of semi-products of biocatalyst synthesis, peaks corresponding to the formed covalent bonds between the enzyme and the carrier were revealed. Synthesized biocatalyst can be used in food industry as bakery improver, in chemical and pharmaceutical industry for production of gluconic acid and in analytical chemistry for determination of glucose concentration.

Keywords: glucose oxidase, immobilization, sodium alginate, biopolymers, alginate microspheres, emulsification, internal gelation

УДК 581.1:58.07.071

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ИУК И БАП НА МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ЗОНЫ АДГЕЗИИ У КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) В НАЧАЛЬНЫЕ ПЕРИОДЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

© 2023 г. Л. Е. Макарова¹ *, Г. П. Акимова¹, А. А. Ищенко¹, П. А. Бизиков¹, Т. В. Копытина¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения
Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 14.06.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Исследовали действие экзогенных 10^{-11} М индолил-уксусной кислоты (ИУК) и 10^{-9} М 6-бензил-аминопурина (БАП) на метаболизм клеток в зоне адгезии корня этиолированных проростков гороха, расположенной на расстоянии 5–15 мм от его апекса, через 1 и 24 ч после инокуляции бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Сравнивали инокулированные ризобиями проростки, не подверженные действию ИУК и БАП (контроль) и выросшие на растворах этих фитогормонов. Данные по активности растворимых и связанных с клеточными стенками пероксидаз и полифенолоксидаз, концентрации в тканях пероксида водорода (H_2O_2), оксида азота (NO), общего содержания растворимых фенольных соединений и флавоноидов (экстрагируемых этилацетатом и н-бутанолом) и нерастворимых фенольных соединений показали усиление защитных ответов в клетках зоны адгезии при действии экзогенной ИУК и их ослабление при действии БАП. Выявленные изменения в метаболизме клеток зоны адгезии объясняют причину положительного влияния на нодуляцию экзогенного БАП и ингибирования этого процесса при действии экзогенной ИУК

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., корень, зона адгезии, бобово-ризобиальный симбиоз, экзогенные ИУК и БАП, пероксидаза, полифенолоксидаза, оксид азота, фенольные соединения, флавоноиды

DOI: 10.31857/S055510992301004X, EDN: CUSFLJ

На начальных этапах нодуляции индолил-уксусная кислота (ИУК) и цитокинины (ЦК) участвуют в инициации образования примордиев клубеньков. В зоне инфицирования ризобиями в начале митотических процессов, предшествующих образованию клубеньковых примордиев в области коры корня, отмечали аккумуляцию ИУК в локусах образования данных структур и изменения соотношения ИУК: ЦК в сторону повышения доли ЦК [1–4]. Такие изменения в аккумуляции и локализации ИУК и ее соотношения с ЦК происходят при участии флавоноидов и пероксидаз (ПО) [2–5]. Изменения в фитогормональном балансе могут быть вызваны окислительными процессами при участии полифункциональных “стрессовых” ферментов с активностью пероксидаз (ПО), ИУК-оксидаз (ИУКО), полифенолоксидазы (ПФО), при этом в качестве регуляторов их активности могут выступать фенольные соединения (ФС) [6]. ПО не только окисляет ИУК, а также предположительно имеет центр специфического связывания с последней [7]. Полагают,

что ПФО и ИУКО имеют общий активный центр на апоферменте [8], а также что они оказывают сходное действие, регулируя содержание ИУК [6]. ПФО в различных клеточных компартментах подвергают окислению разнообразные ФС и с ее активностью может быть связано накопление активных форм кислорода (АФК) и изменение окислительно-восстановительного статуса [9, 10].

Ранее была исследована роль флавоноидов в ингибировании полярного транспорта ауксинов, приводящего к локальному их накоплению в кортексе корней, где инициируются процессы деления клеток и последующее образование примордиев клубеньков [4, 5]. По данным авторов работы [4], при инокуляции ризобиями экспрессия генов, ответственных за синтез флавоноидов, происходит за короткое время, а локальное накопление этих соединений начинается фиксироваться позднее, в течение 24 ч после воздействия ризобиальных Nod-факторов. И в этот же период начинаются нарушения в полярном транспорте ИУК и последующие возникновения очагов деле-

ний клеток с образованием клубеньковых примордиев.

Усиление синтеза ФС рассматривается как проявление защитной реакции на инокуляцию ризобиями, связанной с ауторегуляцией растением инфицирования клеток их корня этими бактериями [11–13]. Возможно, отчасти их участие в этом процессе в тканях корней связано с локальными проявлениями защитных реакций, направленных на противодействие прямому инфицированию их клеток [12].

Значительную роль в регуляции уровней защитных реакций и запуске сигнальных систем для органогенеза клубенька при бобово-ризобиальных взаимодействиях отводят ризобиальным Nod-факторам [14]. При этом каскад защитных реакций у бобового растения, возникающий уже с первых минут инфицирования ризобиями, подобно тому, как и при патогенезе, включает повышение уровня и активное взаимодействие таких вторичных продуктов аэробного метаболизма, как АФК и активных форм азота (АФА). Повышение уровня этих метаболитов в начальный период (в течение 1 ч) после инокуляции эффективными по азотфиксации бактериями *Rhizobium* [15, 16], вероятно, могут запускать синтез ФС [17, 18]. Следует заметить, что увеличение содержания ФС, и в том числе флавоноидов, в корнях бобовых культур фиксировали не ранее, чем через 10 ч от момента инокуляции ризобиями, или под влиянием их Nod-факторов, т.е., до и во время органогенеза клубеньков [4, 19].

К участку корня, где происходит проникновение ризобий и инициируется образование примордия, примыкает не менее важный для формирования бобово-ризобиального симбиоза участок – зона адгезии, которая по мере роста корня возникает в виде прироста со стороны меристемы. При инфицировании ризобиями ее поверхность покрывается слоем бактерий, часть которых образуют с эпидермальными клетками корня прочные связи [20].

Ранее было показано, что метаболизм ФС в клетках зоны адгезии отличался от метаболизма в области корня, где через 24 ч после инокуляции регистрировали начало проникновения ризобий в корневые волоски [13, 20]. В частности, данные по содержанию “растворимых” ФС и их антиоксидантной активности в липофильных системах, содержанию ФС, связанных с клеточными стенками, свидетельствовали об ослаблении участия этих веществ в защитных реакциях в зоне адгезии и об усилении участия – в зоне проникновения.

Повышенные концентрации экзогенной ИУК может негативно действовать на процесс нодуляции [21]. Обработка корней цитокининами, напротив, способствует усилению формирования клубеньков [22]. В работе [23] также показано неоднозначное влияние экзогенных ИУК и ЦК на

метаболизм клеток восприимчивых к ризобиям зоны корня еще в начальный период взаимодействия симбионтов и на нодуляцию. Полученные данные об изменении уровня салициловой кислоты и в активности ПО показали, что ингибированию нодуляции корней, произрастающих на растворе ИУК, способствуют более выраженные, в сравнении с действием экзогенного ЦК, проявления защитных реакций в участке корня, где начинается проникновение ризобий в корневые волоски и возникают зачатки примордиев клубеньков [23].

Цель работы – проследить изменения метаболизма клеток проростков гороха (*Pisum sativum* L.) в зоне адгезии в ответ на одновременное действие *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* и экзогенных фитогормонов – ИУК и ЦК (6-бензиламинопурина) в течение 1 и 24 ч.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использовали этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Аксайский усатый 3, выращенные в темноте при температуре 21°C в кюветах на фильтровальной бумаге, смоченной кипяченной водопроводной водой. Исходным материалом служили 2-суточные проростки, выращенные в тех же условиях. Средние размеры корней у исходных и исследуемых в период 0–60 мин от начала эксперимента составляли 30–35 мм, по окончании эксперимента (24 ч) – 45–50 мм. При проведении экспериментов 2-суточные проростки помещали на фильтровальную бумагу, которую смачивали растворами 10^{-11} М ИУК или 10^{-9} М БАП, а на корни проростков наносили по 1 мл инокулята (титр 10^6 кл./мл) бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамм 1026. Штамм был получен из Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (Санкт-Петербург, Россия). В предварительных экспериментах были подобраны концентрации фитогормонов ИУК и БАП [23, 24]. Критерием выбора концентрации было положительное влияние на рост корня, а в случае с БАП, также и стимуляция образования клубеньков. Подбор титра бактерий, не вызывающего существенных изменений роста корней, и способ нанесения инокулята был отработан ранее [24]. Инокулированные ризобиями контрольные растения росли на воде. Инокулят готовили смывом бактерий с твердой агаризованной питательной среды. Титр в полученной суспензии определяли, измеряя плотность суспензии при 675 нм на планшетном спектрофотометре “Immunochem-2100” (“High Technology Inc.”, США).

Из участка корня, расположенного на расстоянии 5–15 мм от кончика корня с помощи бритвы вырезали отрезки корней для исследований в начале экспозиции (0–60 мин) и через 24 ч.

Определение активности полифенолоксидазы. Две фракции ПФО “растворимую” (цитоплазматическая) и связанную с клеточными стенками, выделяли как описано в работе [25]. Фиксированные жидким азотом отрезки корня гомогенизировали в 0.01 М фосфатном буфере (pH 6.0), гомогенат центрифугировали при 1800 g 20 мин, отделяли супернатант, содержащий ПФО “растворимой” фракции. Из осадка 1 М NaCl экстрагировали ионно-связанную ПФО, а затем обработкой 0.25%-ным раствором целлюлазы и пектиназы (“Onozuka”, Япония) ковалентно связанную ПФО. Экстракты, содержащие ионно- и ковалентно связанные с клеточными стенками ПФО, из-за низких показателей во фракции 2 (на 2 порядка), объединяли в общую фракцию “связанных с клеточными стенками”.

Активность ПФО определяли спектрофотометрически по изменению оптической плотности (ОП) при 420 нм за 1 мин в реакционной смеси с субстратом для окисления — пирокатехином [26]. В состав реакционной смеси входили: 2 мл 0.05 М фосфатного буфера, pH 7.0, 0.5 мл белковой вытяжки и 0.5 мл 0.05 М раствора пирокатехина. Активность ферментов выражали в условных единицах в расчете на 1 г сырой ткани.

Определение активности пероксидазы. Выделение разных форм ПО — растворимой, ионно- и ковалентно связанной с клеточными стенками и определение их активности осуществляли по методикам, описанной в работе [23]. В соответствии с описанным методом после гомогенизации растительного материала в фосфатном буфере (pH 6.2), центрифугированием отделяли супернатант, содержащий растворимые формы пероксидаз. Затем из промытого раствором 2%-ного Тритона X-100 нерастворимого осадка экстрагировали 1 М NaCl ионно связанные, а после обработки смесью 0.25%-ных растворов пектиназы и целлюлазы (соотношение 1 : 1) — ковалентно связанные формы пероксидаз. На каждом этапе экстракции центрифугировали по 15 мин при 5000 g и 4°C.

Для определения оксидазной (прооксидантной) активности фермента в качестве субстрата использовали ИУК, пероксидазной (антиоксидантной) — *o*-дианизидин. Активность ПО (усл. ед./г сырой массы) определяли по начальной скорости окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. ИУКО (мкг/мин г сырой массы) — по убыли ИУК в реакционной смеси.

Определение содержания перекиси водорода. Содержание H_2O_2 в гомогенате отрезков корней определяли спектрофотометрически (СФ-Hitachi U-1100, “Hitachi”, Япония) при 560 нм с использованием индикатора ксиленового оранжевого [15]. Количество H_2O_2 рассчитывали по калибровочному графику, построенному для разных кон-

центраций H_2O_2 , и выражали в мкМ/г сырой массы отрезка корня.

Определение содержания NO. Для изучения динамики генерации оксида азота в корнях проростков гороха определяли интенсивность флуоресценции NO в течение 1 ч с интервалом в 10 мин на соответствующих варианту опыта средах. Для этого отрезки корней (3 шт.), взятые у проростков на расстоянии 5–15 мм от кончика корня, окрашивали в среде, содержащей 10 мкМ DAF-2DA (5,6-диаминофлуоресцеиндиацетат, “Sigma-Aldrich”, США) в 10 мМ Трис-HCl буфере, pH 7.4. Окрашивание проводили в течение 20 мин на чашке и при температуре 26°C. Из окрашенных отрезков получали поперечные срезы (не менее 10) толщиной 100–150 мкм и анализировали на флуоресцентном микроскопе AxioObserver Z1 (“Zeiss”, Германия) с цифровой монохромной камерой Axio CamMRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений “AxioVision Rel.4.6”, с использованием блока фильтров № 10 с длиной волны возбуждения 450–490 нм, эмиссией 515–565 нм. Интенсивность флуоресцентного свечения выражали в относительных единицах (отн. ед.). Кривая изменения уровня NO строилась относительно показателей флуоресценции в начале эксперимента (% от 0 мин).

Получение экстрактов фенольных соединений (ФС). Экстракты ФС получали из растительного материала, зафиксированного 96%-ным этанолом и затем гомогенизированного. Выделение ФС проводили по ранее разработанной схеме [27, 28]. ФС экстрагировали 80%-ным этанолом (50 мл на 1 г растительного материала, 3–4-кратно), а после его удаления на ротаторном испарителе, водный остаток подкисляли 2 н HCl до pH 3–4 и экстрагировали этилацетатом растворимые липофильные ФС (фракция I), а затем *n*-бутанолом в соотношении 1 : 1 (об.) 3–4-кратно водорастворимые ФС (фракция II). Из нерастворимого остатка (клеточные стенки) после 1-часового гидролиза 2 н HCl на кипящей водяной бане экстрагировали “нерастворимые” ФС (фракция III) этилацетатом в соотношении 1 : 1 (об.) 3–4-кратно. Полученные экстракты упаривали в условиях затемнения в вакууме досуха, сухие остатки растворяли в небольшом объеме 95%-ного этанола для определения в них общего содержания ФС и флавоноидов.

Определение содержания фенольных соединений. Содержание ФС определяли с реактивом Фолина-Дениса по стандартной методике [29]. Количество ФС рассчитывали по калибровочному графику, построенному для кемпферола, и выражали в мкг/г сырой массы отрезка корня.

Определение содержания флавоноидных соединений. Содержание флавоноидов в экстрактах, содержащих растворимые ФС, определяли по ме-

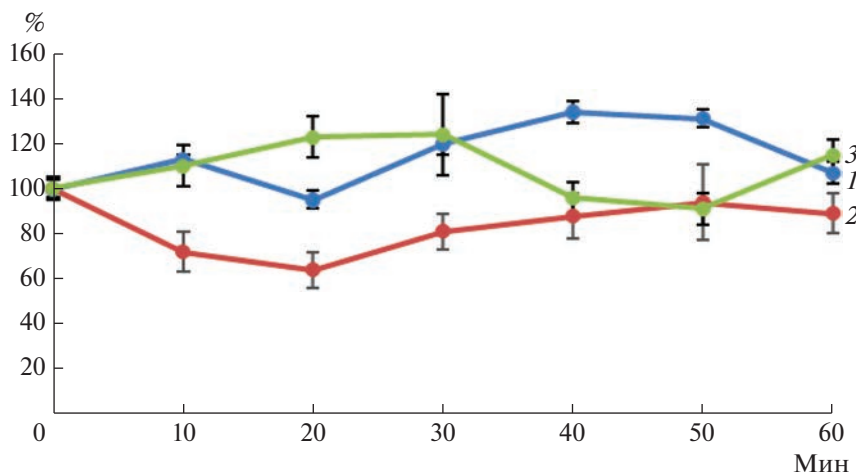


Рис. 1. Влияние экзогенных 10^{-9} М БАП и 10^{-11} М ИУК на динамику интенсивности флуоресценции (% от значения в 0 точке) оксида азота в течение 1 ч после инокуляции ризобиями: 1 — рост инокулированных проростков без фитогормонов (контроль); 2, 3 — рост инокулированных проростков на растворах БАП и ИУК соответственно.

тому, описанному в работе [30]. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Spc-ord S-100 (“Karl Zeiss”, Германия) при 510 нм против контроля: 4.5 мл воды + 0.5 этанола. Содержание флавоноидов рассчитывали по калибровочному графику для катехина и выражали как эквиваленты катехина, в мкг/г сырой массы отрезка корня.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Excell. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и стандартные отклонения для них, которые получены из трех независимых экспериментов. Значимость различий между средними значениями определяли, используя *t*-критерий Стьюдента при уровне $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 1 ч от момента помещения проростков в растворы фитогормонов и одновременной инокуляции ризобиями в зоне адгезии наблюдали ранние ответы на действие ИУК и ЦК по изменению уровня NO. Через 24 ч экспозиции в указанных условиях роста проростков в отрезках их корней определяли содержание ФС в трех фракциях экстрагируемых этилацетатом, *n*-бутанолом, и связанных с клеточными стенками, содержание флавоноидов, активность растворимых и связанных с клеточными стенками ПФО.

На рис. 1 представлено сравнение динамики содержания NO в клетках зоны адгезии у корней проростков гороха в течение 1 ч от начала действия на них ризобий (контроль) и при совместном действии бактерий и экзогенных ИУК и БАП. Отмечена разница в характере ответной ре-

акции клеток исследуемого участка корней при одновременном действии на них ризобий и экзогенных ИУК и БАП (рис. 1). ИУК дважды вызывала повышение уровня NO, при этом, 1 повышение происходило ранее, чем при действии ризобий без участия этого фитогормона — в период 10–30 мин, второе — на 60-й мин (рис. 1). В присутствии БАП уровень NO на протяжении того же времени экспозиции был заметно ниже, не только по сравнению с ИУК, но и с контролем. При этом слабое повышение уровня NO при действии БАП имело место, причем в тот же период, как и у контрольных растений — начиная с 30 мин (рис. 1). Обнаруженные существенные различия в динамике NO при действии на корни БАП и ИУК (рис. 1) свидетельствовали о различном влиянии этих фитогормонов на активность NO-синтазной системы в начальный период взаимодействия симбионтов.

Показателями ранней реакции растения на воздействия бактерий также служат данные по изменению содержания АФК, и, в частности, содержания пероксида водорода [14, 15]. Важную роль в регуляции уровня пероксида в растительных клетках отводят пероксидазам, поскольку вследствие полифункциональности эти ферменты могут участвовать в реакциях оксигеназного, пероксидазного и оксидазного окисления в клетках [7]. На рис. 2 приведены отношения показателей содержаний H_2O_2 и активности цитоплазматической ПО в исследуемой зоне в течение 1 ч экспозиции при действии экзогенных фитогормонов по отношению к тем же показателям у растений в контроле. Указанные соотношения показателей позволяют зафиксировать реакцию проростков на одновременное действие на них ризобий и экзогенных БАП и ИУК по сравнению с проростками, на ко-

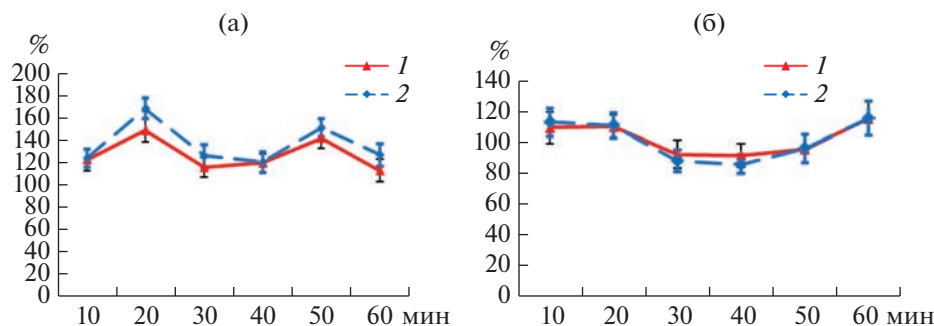


Рис. 2. Влияние экзогенных 10^{-11} М ИУК (1) и 10^{-9} М БАП (2) на динамику изменения содержания H_2O_2 (а, % к контролю) и активность “растворимой” ПО (б, % к контролю) в течение 1 ч после инокуляции ризобиями.

торые воздействовали только эти бактерии. При действии ИУК и БАП выявлено 2 периода повышения содержания H_2O_2 , совпадающих по времени (рис. 2а). Эти повышения уровня пероксида можно оценивать как свидетельство проявления защитных реакций клеток зоны адгезии. При действии обоих фитогормонов активность ПО оказалась максимальной в те периоды, когда в ответ на действие фитогормонов максимально возросло содержание пероксида (рис. 2б). При этом более высокий уровень H_2O_2 , который оказался при действии БАП, а не при действии ИУК (рис. 2а), скорее всего, обусловлен менее активной в клетках этого варианта “растворимой” ПО (рис. 2б).

Сравнение влияния БАП и ИУК на динамику содержания NO и H_2O_2 (рис. 1, 2а) позволяет констатировать различия в характере, интенсивности и времени проявления защитных ответов с участием этих метаболитов в зоне адгезии в течение 1 ч после инокуляции корней ризобиями. При этом обращает на себя внимание, что БАП, по сравнению с ИУК, очевидно, имел выраженный ингибирующий эффект на NO-синтазную систему и в большей степени вызывал повышение уровня пероксида водорода в клетках исследуемой зоны корня.

Через 24 ч от начала инокуляции и помещения корней в растворы с фитогормонами в участке корня на расстоянии 5–15 мм от его апекса было прослежено влияние БАП и ИУК на содержание ФС, активность ПО и ПФО. Данный участок в описанных выше условиях роста корня (см. Методику) сформировался за 24 ч экспозиции с фитогормонами за счет клеток, перешедших из зоны меристемы в зону растяжения. Первоначально исследуемый участок корня (в течение первого экспозиции) за 24 ч удалился от апекса в зону, где наступил следующий этап взаимодействия с ризобиями — начало проникновения последних в корневые волоски [23].

Показано, что активность “растворимых” и связанных с клеточными стенками антиоксидантной ПО через 24 ч выше, чем через 1 ч после начала эксперимента в 1.5–2.0 раза (в зависимости от варианта выращивания). Активность прооксидантной ПО возрастала в меньшей степени, либо не изменялись (ковалентно-связанные с клеточными стенками в контроле и в присутствии БАП). Отношения активности ферментов при действии фитогормонов к тем же показателям в контроле (табл. 1) показали разницу в действии ИУК и БАП, которую оценивали по степени проявлении активности про- и антиоксидантной ПО. Рост на растворе ИУК приводил к заметному возрастанию активности фермента ИУКО, который способен окислять данный фитогормон [6], и, вероятно, в наибольшей степени во фракции связанных с клеточными стенками (табл. 1). Под влиянием же БАП существенно снижалась активность ИУКО в цитоплазме и ПО в клеточной стенке (табл. 1).

Действие фитогормонов в клетках исследуемой зоны вызывало изменение активности другого окислительного фермента — ПФО (табл. 1). Активность ПФО в цитоплазматической фракции у контрольных растений составляла 0.155 ± 0.02 отн. ед./г сырой массы отрезка, а в клеточных стенках она оказалась выше в 1.9 раза. Как следует из данных табл. 1, влияние ИУК в большей мере, чем влияние БАП, приводило к повышению активности этого фермента, и особенно во фракции, связанной с клеточными стенками. В клеточных стенках изменения активностей ИУКО и ПФО были близки как при действии ИУК, так и при действии БАП (табл. 1). В цитоплазме этого не наблюдалось.

Как ответную реакцию на действие неблагоприятных факторов на растение рассматривают повышение содержания ФС в растительных клетках [31]. В настоящей работе представлены данные по содержанию ФС (рис. 3), и в том числе флавоноидов (рис. 4) в исследуемой зоне, полученные через 24 ч после инокуляции. Повышение уровня NO и H_2O_2 в начальный период бобово-ризоби-

Таблица 1. Влияние БАП и ИУК на активность ПО и ПФО в зоне адгезии инокулированных *Rhizobium* корней проростков гороха через 24 ч экспозиции*

Вариант	Цитоплазматический фермент			Фермент, связанный с клеточными стенками		
	ПО, %	ИУКО, %	ПФО, %	ПО, %	ИУКО, %	ПФО, %
+ИУК	107.22 ± 7.4 ^a	112.9 ± 5.1 ^a	124.74 ± 6.8 ^a	106.09 ± 6.1 ^a	131.6 ± 4.5 ^a	134.37 ± 6.5 ^a
+БАП	101.89 ± 7.3 ^a	58.06 ± 4.6 ^b	108.95 ± 4.5 ^b	77.64 ± 7.0 ^b	104.48 ± 6.8 ^b	101.4 ± 4.6 ^b

* Значения ПО, ОИУК, ПФО, — рассчитаны по отношению к контролю. Контроль — рост инокулированных проростков без ФГ. Буквами обозначены статистически значимые различия при $P < 0.05$.

ального взаимодействия может положительно влиять на экспрессию гена *pal*, кодирующего фенилаланинаммиак-лиазу — ключевого фермента фенилпропаноидного пути биосинтеза ФС [17, 18], и генов *chs* и *chi*, кодирующих, соответственно, халкон-синтазу и халкон-изомеразу [17], участвующих в синтезе флавоноидов [32]. По данным литературы, экспрессия обсуждаемых генов при инокуляции обнаружена через 3 ч от ее начала, а накопление ФС фиксировали не ранее 10–13 ч [15, 16].

Флавоноиды являются компонентами растительных клеток, которые наиболее значимы в регуляции уровня фитогормонов в точках формирования примордиев клубеньков [3]. Синтез флавоноидов индуцируется в области проникновения ризобий в корнях бобовых растений под влиянием ризобияльных Nod-факторов, а в зоне адгезии флавоноиды секретируются во внешнюю среду в составе корневых экссудатов. В работе [2] показано, что в зоне образования примордиев клубеньков после инокуляции ризобиями все изменения в аккумуляции и локализации ИУК происходят при участии флавоноидов и ПО.

Суммарная концентрация ФС (по данным рис. 3) в трех полученных фракциях через 24 ч экспозиции составляла в расчете на г сырой массы зоны в корнях в контроле — 345.5 мкг, а при росте на растворах ИУК и БАП, соответственно, 392.4 и 321.8 мкг. Максимальное содержание ФС в исследуемой зоне наблюдали при действии ИУК, минимальное — при действии БАП. При этом роль ФС исследуемых фракций в метаболизме клеток, несомненно, различалась. Как было показано ранее [26] ФС, входящие в состав фракции, экстрагируемой этилацетатом, представляют собой липофильные ФС с достаточно высокой биологической активностью.

ФС, экстрагируемые н-бутанолом, это хорошо растворимые в воде компоненты, вероятно, локализующиеся в вакуолях [33], их биологическая активность низка [28]. Концентрацию ФС данной фракции в клетках зоны адгезии повышали БАП и, еще более — ИУК. Вероятно, это связано с усилением растяжения клеток [23], сопряженным с усилением вакуолизации в исследуемой зоне корня. На это указывает аналогичная тенденция прироста за 24 ч экспозиции корней в тех же вариантах выращивания.

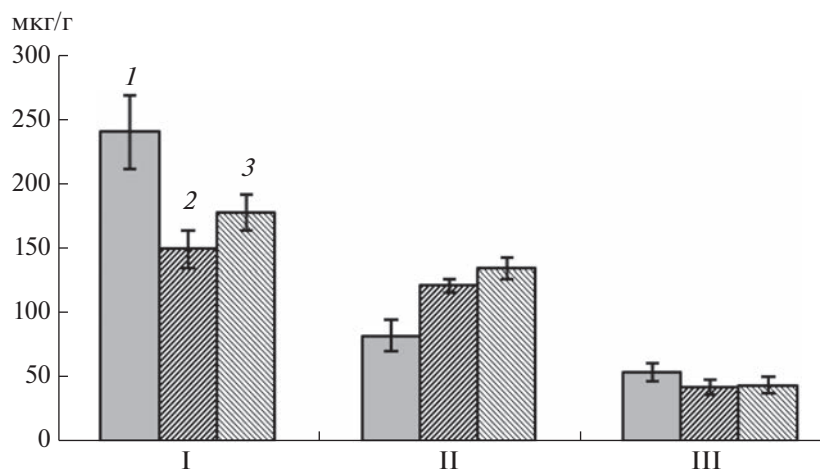


Рис. 3. Влияние экзогенных БАП и ИУК на содержание ФС (мкг/г сырой массы), экстрагируемых этилацетатом (I), н-бутанолом (II) и высвобождаемых из клеточных стенок (III), в зоне адгезии через 24 ч после инокуляции *Rhizobium*: рост инокулированных *Rhizobium* проростков на воде (1, контроль), на 10⁻⁹ М БАП (2), 10⁻¹¹ М ИУК (3).

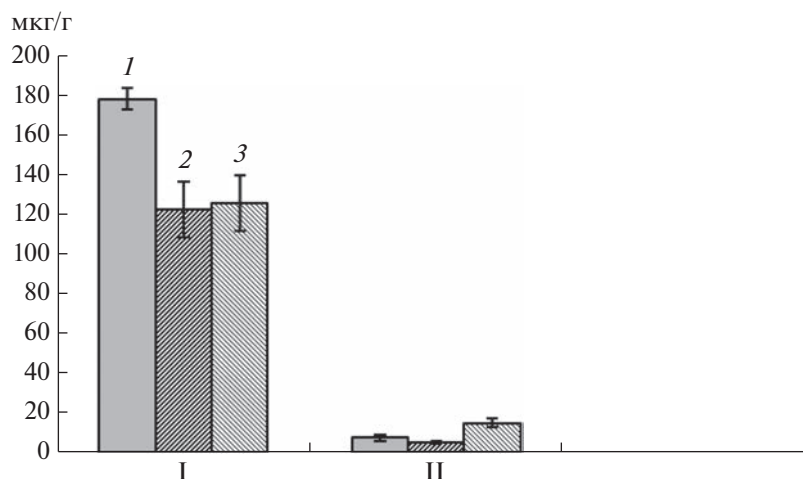


Рис. 4. Влияние экзогенных БАП и ИУК на содержание флавоноидов (мкг/г сухой массы) во фракции экстрагируемых этилацетатом (I) и н-бутанолом (II), в зоне адгезии через 24 ч после инокуляции *Rhizobium*, 1, 2, 3 — как на рис. 3.

ФС третьей фракции играли важную роль в укреплении клеточных стенок [31]. В образовании связей между ФС и компонентами клеточных стенок участвуют ПО [34]. Очевидно, именно более низкая активность этих ферментов в варианте с БАП (табл. 1) может служить объяснением наиболее низкого, по сравнению с контролем и вариантом с ИУК количества ФС, высвобождаемых из клеточных стенок (рис. 3). Обнаруживаемое при этом повышение активности ПФО в цитоплазме и клеточных стенках в варианте с ИУК (табл. 1), вероятно, связано с окислением данного фитогормона [6].

Состав биологически активной группы ФС, входящих во фракцию экстрагируемых этилацетатом, может зависеть от внешних обстоятельств [35]. Так, в тканях зоны проникновения под влияние БАП и ИУК может повышаться содержание салициловой кислоты [23], отнесенной к негативным регуляторам нодуляции [36].

Важными компонентами для процессов нодуляции при бобово-ризобальном симбиозе являются некоторые флавоноиды. Их роль в зоне проникновения ризобий — инициация образования примордиев клубеньков, а в зоне адгезии — как индуктора экспрессии ризобальных *nod*-генов, в основном в связи с их активностью в составе корневых экссудатов [3]. Оба фитогормона в участке корня, относящегося к зоне адгезии, вызывали снижение общего содержания флавоноидов в составе фракции, экстрагируемой этилацетатом (рис. 4). При этом экзогенная ИУК способствовала повышению концентрации флавоноидов в составе бутанольной фракции, а БАП — вызвала небольшое снижение их количества. Однако возникшие при действии фитогормонов изменения в содержании данной фракции флавоноидов на общей тенденции падения концентрации флаво-

ноидов в тканях исследуемого участка корня не отразились. Причины практически одинакового снижения содержания флавоноидов в исследуемой зоне при действии БАП и ИУК не ясны и требуют дальнейших исследований.

Анализ приведенных выше показателей по активности ПО и уровня H_2O_2 в клетках зоны адгезии, позволяет оценить защитную реакцию клеток исследуемой зоны на действие фитогормонов в течение 1 и 24 ч. Приведенные результаты работы свидетельствуют о влиянии экзогенных ЦК на метаболизм клеток зоны адгезии в разные периоды роста корня после его инокуляции бактериями *Rhizobium*. Проанализированные показатели содержания NO, H_2O_2 и активности ПО в ранний период (до 1 ч) взаимодействия симбионтов выявили защитные реакции в клетках исследуемой зоны при действии на них ИУК. Между растениями в контроле и под воздействием БАП и ИУК наиболее существенными были различия по характеру изменения уровня NO (рис. 1). Они показали роль ИУК в более раннем активировании NO-синтазной системы, по сравнению с растениями контроля, на которые действовали только ризобии, так и то, что при действии экзогенных ЦК этот процесс может ингибироваться.

Ответные реакции на действие ЦК и ИУК в клетках исследуемой зоны имели различия и через 24 ч от начала эксперимента, когда в соседнем с зоной адгезии участке корня начиналось проникновение ризобий в корневые волоски [20, 37]. В этот период в зоне адгезии фиксируется существенное усиление активности ПО. При этом активности ИУКО и ПФО оказались заметно выше у растений, на которые действовала экзогенная ИУК. От вида фитогормона зависело содержание ФС в трех исследуемых фракциях. ИУК вызывала

повышение их общего содержания за счет входящих в состав ФС веществ, экстрагируемых бутанолом. Под влиянием БАП обнаружено снижение общего содержания ФС. Оно происходило в наибольшей степени за счет биологически активной фракции “растворимых” ФС, и в меньшей степени за счет ФС, связанных с клеточными стенками. Содержание “растворимых” ФС, по сравнению с контролем, возрастало, но в меньшей мере, чем при действии ИУК. Важной особенностью обоих экзогенно действующих фитогормонов оказалось существенное снижение общего содержания флавоноидов в исследуемой нами зоне. Данное явление требует дальнейших более детальных исследований изменений в их составе. Известно, что определенные виды флавоноидов могут регулировать уровень ИУК в области формирования клубеньков у бобовых растений разных видов [38].

Приведенные результаты показали, что более выраженные защитные реакции при действии ИУК в зоне адгезии имели негативные последствия для нодуляционных процессов. Данное высказывание подтверждают данные, описанные в работе [23], где приводилось исследование экзогенного действия 10^{-9} М БАП и 10^{-11} М ИУК на нодуляцию корней растений гороха. Было установлено небольшое стимулирование нодуляции при действии ЦК и полное ингибирование при действии ИУК. Это дает основание предположить, что подобное ингибирование нодуляции у бобовых культур могут происходить при внесении в их ризосферу микробных препаратов, включающих бактерии с повышенной продуктивностью ИУК, что необходимо учитывать на практике.

Работа выполнена в рамках проекта № госрегистрации 122041100050-6 при использовании оборудования Центра коллективного пользования (ЦКП) “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих Е.А., Кириенко А.Н., Леппянен И.В., Долгих А.В. // Сельскохозяйственная биология. 2016. Т. 51. С. 585–592. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.5.585rus>
2. Mathesius U. // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. № 1. P. 419–426.
3. Reddy P.M., Rendón-Anaya M., de los Dolores Soto del Río M., Khandual S. // Dynamic Soil, Dynamic Plant. 2007. V. 1. № 2. P. 83–94
4. Mathesius U., Bayliss C., Weinman J.J., Schlaman H.R.M., Spaink H.P., Rolfe B.G., VcCully M.E., Djordjevic M.A. // MPMI. 1998. V. 11. № 12. P. 1223–1232. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.12.1223>
5. Mathesius U., Schlaman H.R.M., Spaink H.R., Sautter C., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. // The Plant J. 1998. V. 14. P. 23–34.
6. Ибрагим-заде Х., Абришамхи П. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 2. С. 223–228.
7. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: Изд-во ИрГТУ, 2004. 200 с.
8. Srivastava O.P., Van Huystee R.B. // Can. J. Bot. 1977. V. 55. № 20. P. 2630–2635.
9. Mayer A.M. // Phytochemistry. 2006. V. 67. № 21. P. 2318–2331. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>
10. Webb K.J., Cookson A., Allison G., Sullivan M.L., Winters A.L. // Front Plant Sci. 2014. V. 5. № 94. Article 700. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00700>
11. Vasse J., Billi F., Truchet G. // Plant J. 1993. V. 4. № 3. P. 555–566.
12. Santos R., Hérout D., Sigaud S., Touati D., Purpo A. // MPMI. 2001. V. 14. № 1. P. 86–89.
13. Глянько А.К., Акимова Г.П., Соколова М.Г., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 3. С. 289–297.
14. Glyn'ko A.K. // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2018. V. 14. № 2. P. 36–57. www.jsppb.ru/issues/2018/N2/JSPB_2018_2_36-57.html
15. Акимова Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. № 4. С. 126–131. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131>
16. Ищенко А.А., Филинова Н.В., Сидоров А.В. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. № 2. С. 294–302. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-2-294-302>
17. Ahn S.Y., Kim S.A., Cho K.S., Yun H.K. // Biologia Plantarum. 2014. V. 58. № 4. P. 758–767. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0437-2>
18. Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 17. P. 10328–10333. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.10328>
19. Рудиковская Е.Г., Акимова Г.П., Федорова Г.А., Соколова М.Г., Дударева Л.В., Рудиковский А.В. // Физиология растений. 2010. Т. 57. № 2. С. 266–272.
20. Makarova L.E., Akimova G.P., Sokolova M.G., Luzova G.B., Rudikovskaya E.G., Nurminsky V.N. // Academic Open Internet J. 2004. V. 12. № 2.
21. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. № 4. P. 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
22. Cooper J.B., Long S.R. // Plant Cell. 1994. V. 6. № 2. P. 215–225. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.2.215>
23. Макарова Л.Е., Акимова Г.П., Соколова М.Г., Петрова И.Г. // Физиология растений. 2022. Т. 89. № 2. С. 179–188. <https://doi.org/10.31857/S0015330322010110>
24. Акимова Г.П., Соколова М.Г., Нечаева Л.В. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 5. С. 806–810.
25. Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 6. С. 910–917.
26. Ярош Н.П., Арасимович В.В., Ермаков А.И., Перуанский Ю.В. Определение активности ферментов и их ингибиторов. / В сб.: Методы биохимического

- исследования растений. / Ред. А.И. Ермакова. 3 изд. Л.: Агропромиздат, 1987. С. 36–84.
27. Макарова Л.Е. // Сибирский экологический журн. 2002. № 2. С. 243–247.
 28. Макарова Л.Е., Лузова Г.Б., Ломоватская Л.А. // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 6. С. 824–832.
 29. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа, 1974. 214 с.
 30. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. // Food Chemistry. 1999. V. 64. № 4. P. 555–559.
 31. Макарова Л.Е. // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия биология. 2012. № 2(26). С. 25–40.
 32. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
 33. Озолина Н.В., Макарова Л.Е., Возненко А.Н., Колесникова Е.В., Дударева Л.В. // Химия растительного сырья. 2014. № 3. С. 175–183. <https://doi.org/10.14258/jcprm.1403175>
 34. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Кузьмина О.И. // Биохимия. 2011. Т. 76. № 6. С. 749–763.
 35. Макарова Л.Е., Латышева С.Е., Екимова Е.Г. // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 291–298.
 36. Цыганова А.В., Цыганов В.Е. // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53. № 1. С. 3–14. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.3rus>
 37. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. // Цитология. 2005. Т. 47. № 6. С. 519–525.
 38. Subramanian S., Stacey G., Yu O. // TRENDS in Plant Science. 2007. V. 12. № 7. P. 282–285.

Effect Of Exogenous IAA and BAP on the Metabolism in the Adhesion Zone Cells of the Pea Seedling Roots (*Pisum sativum* L.) in the Initial Periods of Interaction with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

L. E. Makarova^{a,*}, G. P. Akimova^a, A. A. Ischenko^a, P. A. Bizikov^a, and T. V. Kopyrtina^a

^a Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of RAS, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

In the adhesion zone of the etiolated pea seedling roots, located at a distance of 5–15 mm from its apex, 1 and 24 hours after inoculation with the bacteria *Rhizobium*, the effect of exogenous 10^{-11} M indol-acetic acid (IAA) and 10^{-9} M 6-benzylaminopurine (BAP) on cell metabolism was investigated. The inoculated seedlings were used as control that is not exposed to the action of phytohormones. Phytohormone-induced changes in the activity of soluble and cell wall-related peroxidases (PO) and polyphenol oxidases (PPO), tissue concentrations of hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO), “soluble” (extracted by ethyl acetate and n-butanol) and “insoluble” phenolic compounds (PCs), flavonoids are discussed. The analysis of the obtained results shows that in both observation periods, the exogenous effect of the IAA enhanced protective responses in the cells of the adhesion zone, and the action of BAP weakened them. It is shown that the differences in the metabolism of adhesion zone cells resulting from the action of exogenous BAP and IAA are related to their diametrically opposite effect on nodulation.

Keywords: *Pisum sativum* L., root, adhesion zone, legume-rhizobial symbiosis, exogenous IAA and BAP, peroxidase, polyphenol oxidase, nitric oxide, phenolic compounds, flavonoids

УДК 579

НОВЫЙ МЕТОД ЭКСПРЕСС-ДЕТЕКЦИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

© 2023 г. С. Н. Плескова^{1, 2, *}, Е. В. Лазаренко^{1, 2}, И. С. Судакова²,
Р. Н. Крюков¹, Н. А. Безруков^{1, 2}

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Министерство науки и высшего образования, Нижний Новгород, 603950 Россия

²Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева,
Министерство науки и высшего образования, Нижний Новгород, 603115 Россия

*e-mail: pleskova@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2022 г.

После доработки 19.07.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

В работе использовался режим осцилляции атомно-силового микроскопа (АСМ) для создания системы высокочувствительной детекции антибиотикорезистентности в режиме реального времени. Такой режим позволяет оценить чувствительность или резистентность грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Staphylococcus aureus*) бактерий к антибиотику за 15–30 мин. В основе аналитического сигнала (изменения амплитудно-частотных характеристик кантилевера) лежит метаболическая активность бактерий. Бактерии, высаженные на кантилевер, вызывали его колебания с высокой амплитудой. В случае если бактерии чувствительны к антибиотику, амплитуда статистически значимо падала в течение 15–30 мин, если бактерии резистентны, то амплитуда либо не изменялась, либо увеличивалась. Полученные результаты сопоставимы с диско-диффузионным методом.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, атомно-силовая микроскопия, режим осцилляции, диско-диффузионный метод, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

DOI: 10.31857/S0555109923010075, **EDN:** CVOIPK

Устойчивость к антибиотикам является естественным свойством микроорганизмов в различных экосистемах [1]. Однако “экологический прессинг” вызвал ускоренное распространение генов резистентности среди нозокомиальных штаммов. За более чем 70 лет с момента начала производства были синтезированы метатонны антибиотиков и серьезной проблемой стало широкое их использование для самых разных целей [2]. В настоящее время некоторые эксперты предупреждают о возвращении к доантибиотической эпохе. Эти опасения связаны с тем, что открыто уже более 20 000 потенциальных генов резистентности к антибиотикам [3]. Наряду с разработкой и внедрением новых классов антибиотиков и контролем за их рациональным использованием должны разрабатываться методы экспресс-тестирования антибиотикорезистентности, которые обеспечат клиницистов информацией, необходимой для своевременного назначения оптимальной и эффективной терапии и ее коррекции у тяжелых больных с такими заболеваниями как сепсис, тяжелая пневмония, бактериальный эндокардит, перитонит, менингит и др., при которых ошибка в выборе антибактериальной тактики приводит к гибели или

инвалидизации пациента. Диско-диффузионный метод считается золотым стандартом подбора антибиотиков и антимикотиков для этиотропной терапии [5, 6], поскольку имеет целый ряд преимуществ: простота, низкая стоимость, возможность тестировать большое количество микроорганизмов и антимикробных агентов, простота интерпретации полученных результатов. Однако можно отметить и существенные недостатки, поскольку ингибирование роста бактерий не означает их гибель. Кроме того, этот метод не дает информации о бактерицидном или бактериостатическом действии, не подходит для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК), так как невозможно количественно определить количество противомикробного агента, диффундировавшего в среду [7]. Но самым существенным недостатком диско-диффузионного метода является время его выполнения: для получения антибиотикограммы требуется не менее суток, за это время пациенту назначается эмпирическая антибиотикотерапия, что способствует формированию антибиотикорезистентности у микроорганизмов.

В 2015 г. группа С. Казаса [8] сформулировала идею о том, что можно высаживать бактерии на поверхность кантилевера атомно-силового микроскопа (АСМ), который до этого использовался исключительно для исследования морфологии и ригидности живых клеток с высоким разрешением. Бактерии, прикрепленные к кантилеверу АСМ, вызывают колебания, которые напрямую коррелируют с жизнеспособностью микроорганизма. Позднее на основе этого была разработана система быстрой и эффективной детекции антибиотикорезистентности [9]. Эта система позволяла в отличие от диско-диффузионного метода выдавать результат о чувствительности или резистентности бактерий уже через 1–2 ч. В работе [10] были разработаны и апробированы: оптимальные кантилеверы для исследования жизнеспособности бактерий, методы фиксации бактерий на кантилевере, методы детекции различий в колебаниях кантилевера между живыми бактериями и бактериями подвергнутыми воздействию антибиотика с бактерицидной активностью, различия в колебаниях кантилеверов для одного и того же штамма бактерий при его пребывании в системе с антибиотиком, к которому он был чувствителен и в системе с антибиотиком, к которому он был резистентен.

Цель работы — исследование чувствительности/резистентности к антибиотикам грамотрицательных *Escherichia coli* 321 и грамположительных — *Staphylococcus aureus* 2879М бактерий с помощью нового метода экспресс-диагностики антибиотикорезистентности, исследование динамики метаболической активности бактерий и сопоставление данных по антибиотикорезистентности, полученные в режиме осцилляции атомно-силового микроскопа с классическим диско-диффузионным тестом.

МЕТОДИКА

Получение бактериальной суспензии. Штаммы *E. coli* 321 и *S. aureus* 2879М были взяты из коллекции культур микроорганизмов Научно-образовательного центра “Физика твердотельных наноструктур” ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Культуры выращивали на LB бульоне (“Invitrogen”, США) при 37°C 18 ч, после чего их трижды отмывали LB бульоном, центрифугировали при 450 g 5 мин и стандартизовали до концентрации 10^9 кл/мл на спектрофотометре СПЕКС-ССП (“Спектроскопические системы”, Россия) при $\lambda = 670$ нм, что соответствовало 10 МЕ по стандарту МакФарланда.

Диско-диффузионный метод. На чашки Петри со стерильно разлитым ГМФ-агаром (ферментированный гидролизат говяжьего мяса, Научно-исследовательский центр фармакотерапии, Россия) наносили 100 мкл бактериальной суспензии (10^9 кл/мл) и равномерно распределяли ее шпате-

лем по поверхности агара. Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность питательной среды по центру чашки Петри наносили квадраты фильтровальной бумаги, пропитанной антибиотиком. Аппликацию проводили стерильным пинцетом, после чего чашки Петри немедленно помещали в термостат на 24 ч при 37°C. Результат учитывали на следующий день на матовой поверхности в отраженном свете. Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм. При проведении диско-диффузионного метода и учете его результатов использовали рекомендации МУК 4.2.1890–04.

Предобработка кантилевера для фиксации бактерий. Нитрид-кремниевый кантилевер A-MLCT ($f_0 = 22$ кГц, $k = 0.07$ Н/м, “Bruker”, США) функционализировали 0.01%-ным поли-*L*-лизинном (“Merck”, США) при 24°C в течение 10 мин, а затем трехкратно аккуратно отмывали дистиллированной водой. Кантилеверы подсушивали при 24°C 5 мин, после чего на них наносили суспензию бактерий и инкубировали при 37°C 30 мин.

Исследование жизнеспособности бактерий в режиме осцилляции атомно-силового микроскопа. Подробно метод и подбор режимов исследования описаны в работе [10]. Коротко: кантилевер с нанесенной на него суспензией бактерий устанавливали в держатель АСМ-микроскопа NTegra (“NT-MDT”, Россия) и погружали в аналитическую камеру с 5 мл LB-бульона. Для контроля использовали кантилевер, покрытый поли-*L*-лизинном, без бактерий.

Устанавливали лазер в центр четырехсекционного фотодиода, переводили микроскоп в режим регистрации осцилляций (Nova, версия Px.3.4.0 rev 17188, режим Oscilloscope) и снимали аналитический сигнал DFL (разностный сигнал между верхним и нижним участками фотодиода — difference signal between top and bottom halves of the photodiode). Нановибрации в контроле и в опыте с бактериями снимали в течение 60 мин.

Исследование чувствительности/резистентности к антибиотику. После снятия аналитического сигнала DFL для характеристики колебаний живых бактерий из аналитической камеры отбирали 2 мл LB-бульона и вносили 2 мл антибиотика (конечная концентрация 16 мг/мл) 4%-ного раствора гентамицина сульфата (“Микроген”, Россия) для исследования чувствительности/резистентности штамма *E. coli* 321, либо 2 мл 1%-ного раствора (конечная концентрация 40 мг/мл) цефтриаксона (“Биосинтез ПАО”, Россия) для исследования чувствительности/резистентности штамма *S. aureus* 2879М.

Кантилевер с бактериями опускали в раствор гентамицина либо цефтриаксона, инкубировали при 24°C 60 мин, после чего переводили микроскоп в режим регистрации сигнала DFL. Были

отобраны два антибиотика, к одному из которых штаммы *E. coli* 321 и *S. aureus* 2879М были чувствительны, а к другому — резистентны. Цефтриаксон оказался единственным из протестированных антибиотиков, к которому были резистентны оба штамма, поэтому он был выбран в качестве антибиотика, к которому *S. aureus* 2879М резистентен. Выбор гентамицина среди антибиотиков, к которым оба штамма чувствительны, обусловлен несколькими факторами: гентамицин — антибиотик широкого спектра действия, который активно применяется в клинической практике, для него характерна средняя зона отсутствия роста, что позволяет одновременно оценить насколько чувствителен новый метод, физико-химические свойства гентамицина, поскольку плотность гентамицина ближе всего к плотности забуференного физиологического раствора, который в серии предварительных экспериментов использовался в качестве отрицательного контроля.

Обработка полученных результатов. Полученный массив данных обрабатывали в программе Origin Pro 8 SR4 v8.0951. С помощью Фурье-фильтра из аналитического сигнала удаляли колебания с частотами ниже 1 Гц (колебания электросети и другие внешние колебания). Согласно работе [11] частоты колебаний, характеризующие метаболическую активность бактерий, лежат в диапазоне 1.6–5 Гц. Производили определение квадрата стандартного отклонения (вариансы) в каждом из опытов для характеристики амплитуды сигнала кантилевера. При анализе данных для учета вариаций характеристик кантилевера и различий в количестве фиксированных бактерий производили нормировку данных, путем принятия за единицу сигнала DFL от кантилевера с бактериями с последующим принятием за ноль сигнала DFL от кантилевера, функционализированного только поли-L-лизинном.

Контроль жизнеспособности бактерий после эксперимента. После проведения основного эксперимента по исследованию чувствительности/резистентности бактерий аккуратно производили смыв с поверхности кантилевера, затем суспензию бактерий в количестве 100 мкл наносили на чашки Петри со стерильно разлитым ГМФ-агаром, немедленно равномерно распределяя ее шпателем по поверхности агара. После экспозиции чашек Петри при 37°C в течение 24 ч учитывали результат на матовой поверхности в отраженном свете, подсчитывая количество колониеобразующих единиц (КОЕ).

Статистическая обработка. Статистическую обработку проводили в программе Origin Pro 8 SR4 v8.0951 (“Origin Lab Corporation”, США). Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро-Уилка. Поскольку рас-

пределения не соответствовали критериям нормальности, определяли медиану и 25-й процентиль. Для сравнения двух выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали штамм грамположительных *S. aureus* 2879М бактерий, которые не имели жгутиков и, соответственно, собственной двигательной активности и грамотрицательных *E. coli* 321 бактерий, которые характеризовались перетрихальным жгутикованием и высокой двигательной активностью, для того, чтобы доказать, что колебания кантилевера обусловлены метаболической активностью микроорганизмов, а не связаны исключительно с двигательной активностью бактерий [12]. Эти виды микроорганизмов наиболее часто выделяются у пациентов в клинической практике. В частности, *S. aureus* является одним из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций хирургических стационаров и родильных домов [13], а *E. coli* вызывает до 90% инфекций мочеполовой системы [14].

Предварительно с использованием диско-диффузионного метода была исследована чувствительность/резистентность штаммов *E. coli* 321 и *S. aureus* 2879М к целому ряду антибиотиков. Результаты диско-диффузионного метода суммированы в табл. 1.

Из спектра исследованных антибиотиков отобрали два для апробации метода экспресс-диагностики: гентамицин, к которому чувствителен штамм *E. coli* 321 и цефтриаксон, к которому резистентен штамм *S. aureus* 2879М.

На рис. 1 и 2 контроль — собственные колебания кантилевера атомно-силового микроскопа, функционализированного поли-L-лизинном. В режиме осцилляции на верхнюю часть зонда, который выступает в качестве зеркала, падает лазер, который отражается от зонда в центр четырехсекционного фотодиода. Перемещения сигнала отраженного лазера на фотодиоде (аналитический сигнал DFL) характеризуют колебания зонда. Они зависят от амплитудно-частотных характеристик (АЧХ) зонда, поэтому важно снимать контрольный сигнал.

На рис. 1 и 2 (кривые 2) представлены колебания кантилевера с фиксированными на нем бактериями, видно, что бактерии существенно увеличивают осцилляцию кантилевера. Следует отметить, что для *E. coli* 321 осцилляция увеличивалась значительнее, чем для *S. aureus* 2879М, но оба штамма вызывали статистически значимое увеличение аналитического сигнала DFL по сравнению с контролем. Таким образом, усиление осцилляции нельзя объяснить исключительно двигательной активностью бактерий, имеющих жгутики. Вероятнее всего на-

Таблица 1. Результаты диско-диффузионного теста по определению чувствительности/резистентности бактерий к антибиотикам

Антибиотик	Концентрация, мг/мл	Чувствительность (ч)/ резистентность (р)	Зона отсутствия роста, мм
<i>E. coli</i> 321			
Бициллин-3	36	р	—
Гентамицин	40	ч	10
Ванкомицин	100	ч	10
Метрогил	5	ч	8
Рифампицин	20	р	—
Амоксициллин	50	р	—
Ампициллин	5	ч	13
Цефазолин	250	ч	10
Клиндамицин	150	ч	10
Линкомицин	300	ч	11
Цефтриаксон	285	р	—
<i>S. aureus</i> 2879М			
Бициллин-3	36	ч	13
Гентамицин	40	ч	11
Метрогил	5	ч	14
Цефтриаксон	285	р	—
Амоксициллин	50	ч	10
Цефазолин	250	ч	19
Клиндамицин	150	ч	13
Линкомицин	300	ч	18

подвижения бактерий обусловлены их собственной метаболической активностью. Исследованиями Вилларта с соавт. [15] было показано, что нанодвижения дрожжевых клеток существенно замедляются, если вместо полноценной питательной среды, необходимой для метаболизма клеток, использовать фосфатный буфер.

На рис. 1 (кривые 3–5) показывают, что аналитический сигнал DFL статистически значимо падал после 15, 30 и 45 мин пребывания *E. coli* 321 в системе с гентамицином. В этом случае характер аналитического сигнала практически соответствовал нановибрациям кантилевера без бактерий, функционализированного 0.01% поли-*L*-лизинном. Таким образом, новый метод экспресс-диагностики антибиотикорезистентности оказался настолько быстрым и высокочувствительным, что давал ответ о чувствительности бактерий к антибиотику уже через 15 мин, а не через 18–24 ч, как диско-диффузионный метод.

На рис. 2 (кривые 3–5) кривые показывают, что аналитический сигнал DFL возрастает в случае пребывания *S. aureus* 2879М в системе с антибиотиком цефтриаксоном, к которому по результатам диско-диффузионного теста штамм резистентен. Хотя статистически значимых различий между вариансами (квадратами стандартных отклонений), характеризующими изменения АЧХ кантилевера во всем спектре записи нановибраций не обнаружено, идет существенное усиление аналитического сигнала. Поскольку идет увеличение метаболической активности бактерий, можно предположить, что происходила активация синтеза и работы ферментных систем золотистого стафилококка, вызывающих модификацию или деструкцию молекул антибиотика, либо активация насосов, обеспечивающих эффлюкс антибиотика из бактериальной клетки. Учитывая временной отрезок в 15 мин и интенсивность реакции бактерий, эти два механизма наиболее вероятны, менее вероятно подключение и других механизмов: модификация мишени и глобальной

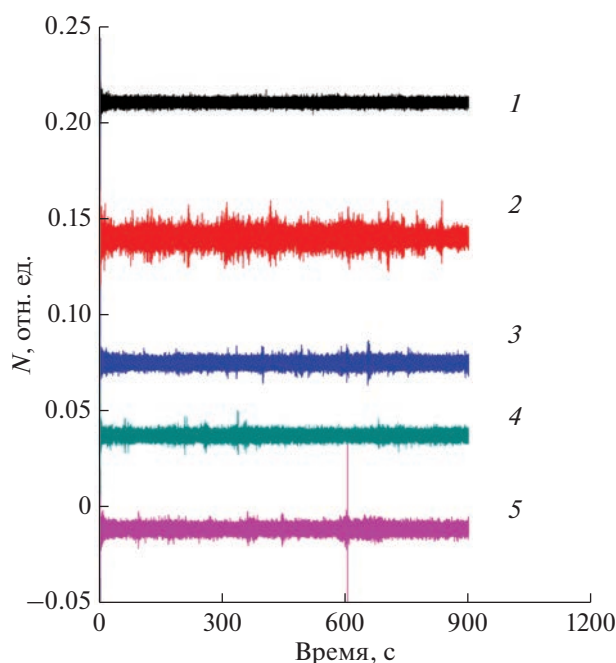


Рис. 1. Амплитудно-частотные характеристики кантилевера при измерении колебаний в режиме осцилляции (представлены результаты одного в серии из 4 воспроизводимых экспериментов): 1 — колебания пустого кантилевера, функционализированного поли-*L*-лизинном; 2 — колебания кантилевера, с фиксированным на нем *E. coli* 321; 3, 4, 5 — колебания кантилевера через 15, 30 и 45 мин соответственно после добавления в систему с *E. coli* 321 гентамицина сульфата в конечной концентрации 16 мг/мл. *N* — нормированная амплитуда колебаний кантилевера. Нормировка произведена путем деления регистрируемого сигнала на суммарный сигнал.

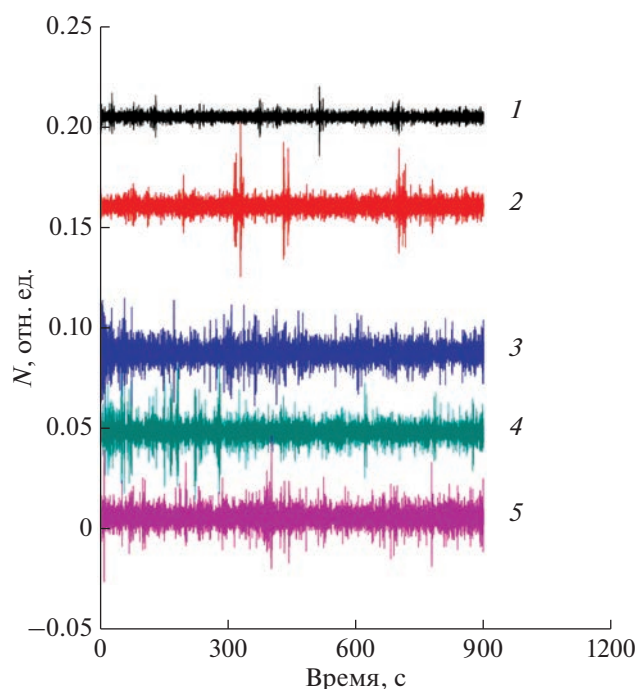


Рис. 2. Амплитудно-частотные характеристики кантилевера при измерении колебаний кантилевера в режиме осцилляции (представлены результаты одного в серии из 4 воспроизводимых экспериментов): 1 — колебания пустого кантилевера, функционализированного поли-*L*-лизинном; 2 — колебания кантилевера, с фиксированным на нем *S. aureus* 2879M; 3, 4, 5 — колебания кантилевера через 15, 30 и 45 мин соответственно после внесения в систему с *S. aureus* 2879M цефтриаксона в конечной концентрации 40 мг/мл. *N* — нормированная амплитуда колебаний кантилевера. Нормировка произведена путем деления регистрируемого сигнала на суммарный сигнал.

адаптации клетки [16]. Для доказательства жизнеспособности *S. aureus* после исследования в среде с антибиотиком производился высев смыва с кантилевера с последующим подсчетом КОЕ. Результаты 5 экспериментов показали, что среднее число КОЕ 649.0 ± 250.1 . Таким образом, было подтверждено, что бактерии резистентны к цефтриаксону, и выживали после проведения эксперимента.

Исследование динамики метаболической активности *E. coli* 321 после пребывания в системе с гентамицином, антибиотиком, к которому данный штамм был чувствителен и *S. aureus* 2879M в системе с цефтриаксоном, антибиотиком, к которому данный штамм был резистентен, представлены на рис. 3.

Первая точка обоих графиков соответствует “нулевому” значению, то есть собственным колебаниям функционализированного кантилевера в контроле, вторая точка получена при осцилляции

кантилевера с фиксированными на нем бактериями без внесения антибиотиков. На эту точку произведено нормирование всех серий экспериментов. Необходимость нормировки обусловлена наличием вариальности отражающей способности покрытия разных партий кантилеверов и незначительной вариальностью в количестве бактерий, фиксируемых на поверхности кантилевера. Последующие точки — средние значения вариантов амплитуд нановибраций кантилевера через 15, 30, 45 и 60 мин после добавления в аналитическую камеру антибиотика соответственно. Очевидно, что уже через 15 мин после внесения антибиотика для этих двух исследуемых штаммов можно дать ответ о чувствительности/резистентности к антибиотикам и этот ответ будет коррелировать с данными диско-диффузионного теста. Для надежности результатов можно увеличить время наблюдения до 30 мин.

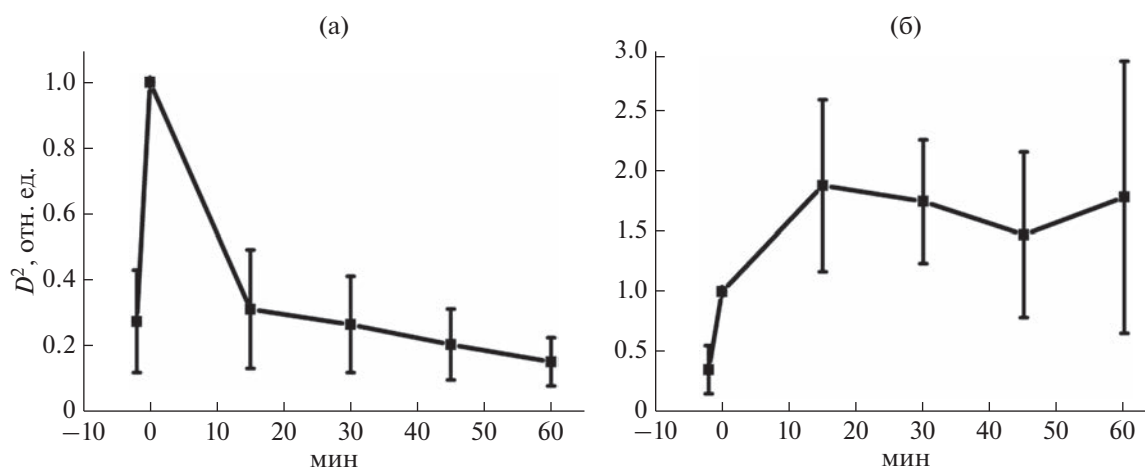


Рис. 3. Динамика исследования резистентности/чувствительности штамма *E. coli* 321 к гентамицину сульфату 16 мг/мл (а) и *S. aureus* 2879M к цефтриаксону 40 мг/мл (б). D^2 — нормированная дисперсия (варианса) амплитуды колебаний кантилевера. *Различия статистически значимы ($p < 0.05$)

Таким образом, разработан принципиально новый метод экспресс-диагностики антибиотикорезистентности грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, который позволяет с высокой скоростью и чувствительностью дать ответ о резистентности штаммов к антибиотикам и корректировать антибиотикотерапию.

Работа выполнена в рамках программы стратегического академического лидерства “Приоритет-2030” Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского при поддержке Российского научного фонда, № проекта 22-14-20001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crofts T.S., Gasparrini A.J., Dantas G. // Nat. Rev. Microbiol. 2017. V. 15. P. 422–434.
2. Davies J., Davies D. // Microbiol. Mol. 2010. V. 74. № 3. P. 417–433.
3. Liu B., Pop M. // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. № 1. P. 443–447.
4. Nathwani D., Varghese D., Stephens J., Ansari W., Martin S., Charbonneau C. // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2019. V. 8. № 35. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0471-0>
5. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard / Ed. 7, CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
6. CLSI, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. / Ed. 2, CLSI document M44-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
7. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. // J. Pharm. Anal. 2016. V. 6. № 2. P. 71–79.
8. Kasas S., Ruggeri F.S., Benadiba C., Maillard C., Stupar P., Tournu H. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. V. 112. № 2. P. 378–381.
9. Venturelli L., Kohler A.C., Stupar P., Villalba M.I., Kallauzi A., Radotic K. et al. // J. Mol. Recognit. 2020. V. 33. № 12. P. 1–14.
10. Pleskova S.N., Fomichev O.I., Kriukov R.N., Sudakova I.S. // Biophysics. 2021. V. 66. № 6. P. 950–955.
11. Villalba M.I., Stupar P., Chomicki W., Bertacchi M., Dietler G., Arnal L. et al. // Small. 2018. V. 14. № 4. 1702671. <https://doi.org/10.1002/smll.201702671>
12. Kasas S., Malovichko A., Villalba M.I., Vela M.E., Yantorno O., Willaert R.G. // Antibiotics. 2021. V. 10. № 3. 287. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030287>
13. Pal S., Sayana A., Joshi A., Juyal D. // J. Family Med. Prim. Care. 2019. V. 8. № 11. P. 3600–3606.
14. Lee D.S., Lee S.J., Choe H.S. // Biomed. Res. Int. 2018. V. 26. 7656752. <https://doi.org/10.1155/2018/7656752>
15. Willaert R.G., Vanden Boer P., Malovichko A., Alioscha-Perez M., Radotic K., Bartolic D. et al. // Sci. Adv. 2020. V. 6. № 26. eaba3139. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3139>
16. Munita J.M., Cesar A. // Microbiol. Spectr. 2016. V. 4. № 2. 1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

A New Method for Express Detection of Antibiotic Resistance

S. N. Pleskova^{a, b, *}, E. V. Lazarenko^{a, b}, I. S. Sudakova^b, R. N. Kriukov^a, and N. A. Bezrukov^{a, b}

^a N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University,
Ministry of Science and Higher Education, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^b R.E. Alekseev Nizhny Novgorod State Technical University,
Ministry of Science and Higher Education, Nizhny Novgorod, 603115 Russia

*e-mail: pleskova@mail.ru

The oscillation mode of an atomic force microscope (AFM) was used to create a highly sensitive real-time detection system for antibiotic resistance. This mode allows to evaluate the sensitivity or resistance of Gram-negative (*Escherichia coli*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria to an antibiotic in 15–30 minutes. The analytical signal (changes in the amplitude-frequency characteristics of the cantilever) is based on the metabolic activity of bacteria. Bacteria was adding on the cantilever and was causing it to oscillate with high amplitude. If the bacteria are sensitive to the antibiotic, the amplitude drops statistically significant within 15–30 minutes, if the bacteria are resistant, then the amplitude either does not change or increases. The obtained results were comparable with the disk diffusion method.

Keywords: antibiotic resistance, atomic force microscopy, oscillation mode, disk diffusion method, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

УДК 577.112:577.322.5:57.083.3

МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОГО РЕЦЕПТОРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ BlaR-CTD ДЛЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

© 2023 г. Т. С. Серченя¹*, П. А. Семижон², Е. П. Счесленок²,
И. В. Горбачева¹, И. И. Вашкевич¹, О. В. Свиридов¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220141 Беларусь

²Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, 220114 Беларусь

*e-mail: serchenya@iboch.by

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 29.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Разработана биоаналитическая сэндвич-система для количественного определения рекомбинантного рецептора бета-лактамов BlaR-CTD, обладающего лигандсвязывающей активностью и иммунореактивностью. В этой тест-системе BlaR-CTD из биологической жидкости или калибровочной пробы связывается за счет рецепторного сайта с иммобилизованным в лунке микропланшета ампициллином, а через эпитопы периферической структуры взаимодействует со специфическими поликлональными антителами. Аналитическая чувствительность метода оказалась равной 2 нг/мл, рабочий диапазон составил 5–215 нг/мл. Проведен мониторинг биологической активности и дана оценка стабильности BlaR-CTD в процессах его гетерологической экспрессии, выделения и приготовления реagentных форм. Получен высокоочищенный рекомбинантный рецептор бета-лактамов BlaR-CTD. Показано, что этот белок обладал достаточно высокой устойчивостью к денатурации хаотропными агентами (мочевина и гуанидингидрохлорид) и стабилен в широком диапазоне pH среды. Кроме того, предложены конструкции и методики применения конкурентных систем для биоанализа бета-лактамовых антибиотиков, основанные на рецепторных и антигенных свойствах BlaR-CTD, в микропланшетах (аналитическая чувствительность 0.02 нг/мл, $IC_{50} = 0.28$ нг/мл) и на хроматографических тест-полосках (предел обнаружения 1–2 нг/мл).

Ключевые слова: бета-лактамы антибиотиков, рецепторы бета-лактамов, белок BlaR-CTD, иммуноанализ, рецепторный анализ бета-лактамов

DOI: 10.31857/S0555109923010105, **EDN:** CVMIEW

Антибиотики широко применяются в ветеринарной медицине в качестве профилактических средств для предотвращения заболеваний у здоровых животных и терапевтических препаратов для лечения заболевших особей. Из-за избыточного и неправильного использования эти лекарства загрязняют продукты питания человека и порождают проблему накопления, распространения и эволюции устойчивых к антибиотикам бактерий. Остаточные количества антибиотиков в продукции животного происхождения законодательно регламентируются в мировом масштабе [1]. Для контроля применяют биоаналитические способы скрининга, преимущественно иммуноанализ, и инструментальные методы подтверждения — главным образом высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрической детекцией [2–4].

Все это относится и к бета-лактамам — пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам и монобактамам, которые являются одними из наиболее используемых антибиотиков в мире. Родоначальником пенициллинового ряда выступает природное соединение бензилпенициллин (пенициллин G), известный с сороковых годов прошлого столетия. Кроме него максимально допустимые уровни (в мкг/кг) в разных видах продовольствия установлены для полусинтетических субстанций, включающих амоксициллин, ампициллин (по 4–50 мкг/кг), оксациллин, флоксациллин, диклоксациллин, нафциллин (по 30–300) и клавулановую кислоту (по 100–400), а также для еще одного природного антибиотика феноксиметилпенициллина или пенициллина V (25–250). Из цефалоспоринов контролируются цефепим (10–50), цефтриаксон, цефалотриаксон (по 20–100), цефопера-

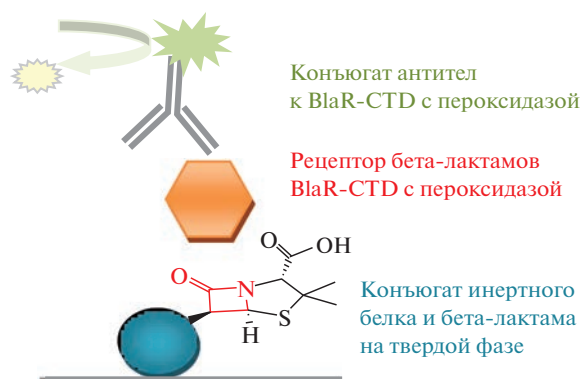


Рис. 1. Схема конструкции гетерофазной рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА-BlaR-CTD.

зон, цефазолин (по 50), цефтиофур, цефалексин (по 100) и цефакетрил (125) [5, 6].

Уже на протяжении многих лет целям обнаружения и количественного определения бета-лактамовых антибиотиков в различных пищевых матриксах служит иммуноанализ, основанный на реакции антиген-антитело в системах различных конструкций. Известны способы синтеза иммуногенных конъюгатов пенициллинов и цефалоспоринов с инертными белками и получения поликлональных или моноклональных антител, способных узнавать в конкурентной реакции связывания несколько близких структурных аналогов каждого ряда и среди них антиген с детектируемой меткой в растворе или иммобилизованный на твердой фазе. Отметим, что лишь в единичных случаях удается получить высокоаффинные антитела и достичь требуемой чувствительности анализа [7–11]. Не описаны антитела, взаимодействующие со всеми или многими пенициллинами или цефалоспориновыми, не говоря уже об их групповой специфичности в отношении полного перечня контролируемых бета-лактамов. К тому же каждый из препаратов антител имеет свой уникальный набор свойств, что создает трудности в стандартизации иммуноаналитических методик и тест-систем.

Следует подчеркнуть, что молекулярным элементом, определяющим химическое поведение и антибактериальную активность всех обсуждаемых соединений, является четырехчленное бета-лактамное кольцо. Этот фрагмент на примере пенициллинов представлен на рис. 1. Из-за структурного напряжения в кольце бета-лактамы активны в химических реакциях, в частности, они легко подвергаются гидролизу в водных растворах. Распад важнейшего структурного фрагмента бета-лактамовых антибиотиков протекает также под действием β -лактамаз в бактериальных клетках, что приводит к полной инактивации лекарственной субстанции. Способность этих ферментов связы-

вать бета-лактамы была использована для разработки биоанализа антибиотиков, в котором бета-лактамы из исследуемой или градуировочной пробы блокирует в активном центре β -лактамазы эпитопы связывания специфического моноклонального антитела [12]. В ветеринарной химиотерапии для ингибирования бактериальных β -лактамаз в состав препаратов вводят уже упоминавшуюся выше клавулановую кислоту, имеющую бета-лактамное кольцо в своей структуре.

Однако открытие, исследование и применение *in vitro* совсем других бактериальных белков, проявляющих сродство к бета-лактамам, обеспечило значительное развитие биоанализа данного класса антибиотиков. Речь идет о мембранных рецепторах бета-лактамов в бактериальных клетках, например в *Streptococcus pneumoniae*, получивших название пенициллинсвязывающие белки (PBP) [13–17]. Природная функция PBP ферментная, так как они участвуют в биосинтезе пептидогликанов клеточной стенки бактерии в качестве DD-трансспептидаз. Бета-лактамный цикл антибиотика имитирует дипептидную структуру D-Ala–D-Ala в пептидогликанах и за счет этого рецептор-фермент связывает данные лиганды, создавая условия для ключевой стадии их антимикробного действия. В бактериальной клетке при лечении инфицированного животного белок-рецептор выступает в качестве мишени введенного бета-лактамового антибиотика. После связывания лекарственной субстанции его напряженное бета-лактамное кольцо раскрывается и происходит ацилирование остатка серина в активном центре белка, что ингибирует ферментативный процесс формирования клеточной стенки микроорганизма. Образование нековалентного комплекса между PBP и бета-лактамом происходит и в биоаналитической системе, но оно не приводит к химической модификации активного центра рецептора из-за крайне малых концентраций реагентов. Результаты такого лиганд-белкового связывания разные: в системе *in vitro* происходит высокочувствительная детекция бета-лактама, а *in vivo* прекращается функционирование рецептора, что вызывает гибель болезнетворной бактерии. Научные исследования механизмов возникновения лекарственной устойчивости к бета-лактамам, обусловленной мутациями в активном центре рецептора и снижением сродства к этим антибиотикам, стимулировали развитие генетической инженерии PBP и появление целого ряда рекомбинантных вариантов, различающихся по аффинитету и специфичности в отношении пенициллинов и цефалоспоринов [18]. Общность механизмов лекарственного действия бета-лактамов и их распознавания в рецепторной системе *in vitro* позволяет утверждать, что все фармацевтически активные субстанции этого класса антибиотиков должны с той или иной степенью чувствительности детектироваться рецептором.

И, наоборот, биоаналитически негативные в этой системе детекции новые бета-лактамы препараты не должны обладать антибактериальной активностью. То есть в принципе рецепторная система может положительно проявлять себя и в скрининге новых бета-лактамов на биологическую (антибактериальную) активность.

К суперсемейству РВР, представители которого специфически связывают и гидролизуют бета-лактамы антибиотики с участием остатка серина в активных центрах, относится и трансмембранный белок BlaR — рецептор бета-лактамов антибиотиков и трансдуктор сигнала в индуцируемом бета-лактамами синтезе бета-лактамазы *Bacillus licheniformis* [19]. Этот белок состоит из N-концевой внутриклеточной части (**BlaR-NTD**, остатки 1–345) и C-концевого домена (**BlaR-CTD**, остатки 346–601), экспонированного вне клетки. Цельный белок включает четыре трансмембранных сегмента и три петли, две из которых расположены в цитоплазме. Сенсорный домен BlaR-CTD выполняет рецепторную функцию и специфически связывает бета-лактамы, который затем ацилирует остаток серина в активном центре. Структурные изменения формируют сигнал, передающийся через трансмембранную область в большую петлю BlaR-NTD и вызывающий ее гидролитическое действие, в результате которого инактивируется белок-репрессор, включается транскрипция гена и осуществляется синтез бета-лактамазы.

BlaR-CTD был гетерологически экспрессирован в *E. coli* в форме водорастворимого пенициллинсвязывающего белка с молекулярной массой 26 кДа [20]. Более продуктивный штамм *E. coli* и трехстадийная методика высокой очистки (99%) рекомбинантного BlaR-CTD в препаративных количествах описаны в работах [21, 22]. Анализ кристаллической структуры BlaR-CTD [22] показал, что его полипептидная цепь свернута в 2 домена с полостью лигандсвязывающего центра между ними. Интересно, что BlaR-CTD и β -лактамаза класса D имеют близкие характеристики фолдинга и схожие топологии лигандсвязывающих сайтов. Однако на основании кинетических параметров реакции активного центра BlaR-CTD с бета-лактамами антибиотиками [21, 22] сделано заключение о том, что эта сенсорная часть BlaR является высокочувствительным РВР, но не β -лактамазой. Интересно, что в экспрессированном и очищенном сенсорном домене BlaR из *Staphylococcus aureus* химическая модификация бета-лактамом остатка серина в лигандсвязывающем центре активировалась необычным карбоксилсвязывающим лизилом, обнаруженным в этом белке [23]. Существенные конформационные изменения, которые развивались в полипептиде от образования комплекса с антибиотиком до завершения реакции ацилирования, считают главным

структурным процессом феномена передачи сигнала внутрь клетки [23].

В последнее десятилетие появились публикации об эффективном применении рекомбинантного BlaR-CTD из *B. licheniformis* дикого и мутантного типов в рецепторноаналитических системах различных форматов, предназначенных для количественного определения широкого спектра бета-лактамов антибиотиков в пищевых продуктах [24–27]. По мере совершенствования методик гетерологической экспрессии этого рецептора и конструкций тест-систем с его применением [24, 26, 27], а также повышения стабильности и аффинитета путем направленного мутагенеза [25, 26] увеличивалась чувствительность детекции бета-лактамов, а групповая специфичность определения расширилась от 15 [24] до 21 [26], а затем до 33 [27] антибиотиков этого класса. В новой по конструкции тест-системе мембранной хроматографии конъюгат бета-лактама иммобилизован на тест-полоске, а в подвижной фазе мутантный BlaR-CTD-M (I188K/S19C/G24C) иммунохимически связан с золотыми наночастицами через адсорбированное на них моноклональное антитело [27].

Таким образом, важными для конструирования биоаналитических систем оказываются не только взаимодействия рецептора с лигандами, но и его реакции как антигена, например, в ходе биоспецифической иммобилизации на твердофазных антителах [11]. BlaR-CTD и другие рекомбинантные рецепторные белки могут частично или полностью терять лигандсвязывающую активность и/или иммунореактивность в процессах экспрессии, очистки, транспортирования, хранения и обработок перед применением.

Цель настоящего исследования — разработка метода количественного определения в культуральных жидкостях, биологических средах и растворах BlaR-CTD, эффективного в качестве базового реагента биоаналитических систем, основанных на рецепции бета-лактамов антибиотиков и взаимодействия рецептора со специфическими антителами.

Примененный в работе методический подход может быть полезным для мониторинга процессов получения, выделения, хранения и применения также и других важных для практики рекомбинантных рецепторов, например, микробного белка, связывающего тетрациклины [28].

МЕТОДИКА

Реагенты и материалы. В экспериментальной работе использовали: трис, хлорид кальция, бычий сывороточный альбумин, пероксидазу из корней хрена, 30%-ный водный раствор H_2O_2 , 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), гуанидингидрохлорид, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

(ИПТГ), каприловую кислоту, додецилсульфат натрия (ДДС), акриламид, бисакриламид, β -меркаптоэтанол, кумасси синий R 250, консерванты тимеросаль, проклин 300 и 5-бromo-5-нитроо-1,3-диоксан (BND, “Sigma-Aldrich”, США), глицерин, стандарты для электрофореза, колонки Zeba для обессоливания, ферменты XhoI, SmaI, T4 ДНК-лигаза (“Thermo Fisher Scientific”, США), SmArtTaq-полимеразы (“АртБиоТех”, Беларусь), диметилсульфоксид, мочевию, лактозу (“Applischem”, Германия), хлорид натрия, имидазол, хлорид магния, твин-20, кислоту лимонную моногидрат (“Merck”, Германия), сахарозу (“Riedel-de Haën”, Германия), колонки с Sephadex G-25 (“GE Healthcare”, США). Применявшиеся реактивы отечественных и российских производителей – натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, гидроокись натрия, соляная кислота, серная кислота, глицерин – имели классификацию не ниже “ч. д. а.”. Антитела козы против иммуноглобулинов мыши были получены на Опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси. Сухие порошки высокоочищенных антибиотиков пенициллина G и ампициллина приобретены у “Sigma-Aldrich” (США).

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF фирмы “Sartorius” (Германия).

При проведении рецепторно-ферментного анализа в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные микропланшеты с 96 лунками от фирмы “Хема-медика” (Россия). Системы хроматографического анализа на тест-полосках конструировали с применением комплекта мембран из набора MDI Easypack (“Advanced Microdevices”, Индия), использовали нитроцеллюлозную мембрану CNPF с размером пор 10 мкм, мембрану для образца GFB-R7L и верхнюю впитывающую мембрану AP045.

Рекомбинантный мутантный белок BlaR-STD-M был любезно предоставлен проф. Chuanlai Xu (Цзяннаньский университет, КНР).

Спектральные измерения. Спектры поглощения препаратов рецепторного белка и очищенных антител снимали в кювете с длиной оптического пути 1 см на приборе Tecan Infinite 200 (Австрия).

Масс-спектры. Масс-спектры MALDI-TOF регистрировали на приборе Microflex LRF “Bruker” (Германия).

Электрофоретический анализ. Электрофорез продуктов амплификации бактериальной ДНК и продуктов рестрикции плазмидной ДНК проводили в 2 и 0.8%-ных гелях агарозы и визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием.

При оценке уровня экспрессии рекомбинантного белка, анализе хроматографических фракций и конечного препарата рекомбинантного полипептида, а также препарата очищенных антител электрофоретический анализ проводили в 12 и 15% ПААГ в присутствии ДДС по Лэммли. Для окрашивания белков использовали Кумасси R 250.

Бактериальные штаммы и клеточные линии. Бактериальный штамм *Bacillus licheniformis* B-80541 был получен из Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт” (аналог штамма ATCC 14580) и использован как источник ДНК. Для проведения генно-инженерных работ и накопления гибридной плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli* DH5 α (“Promega”, США). Для получения рекомбинантного полипептида после индукции ИПТГ применяли штамм *E. coli* BL21 (DE3).

Выделение ДНК, получение праймеров и проведение ПЦР. Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов “НК-экстра” (Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии эпидемиологии и микробиологии, Беларусь).

Анализ нуклеотидных последовательностей для выбора и последующего синтеза олигонуклеотидных затравок (праймеров), а также для определения оптимальных условий проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполняли с использованием программ “Gene Runner 3.00” и “Vector NTI Advance 9.1”.

Праймеры для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего карбокситерминальный пенициллинсвязывающий рецептор, имели следующую нуклеотидную последовательность 5' $\rightarrow$ 3' – GCCTCGAGTATGCAAAGAGATACGCACTTTT (BlaR-F) и CGCCCGGGTTATCGGGAAGCGGATGG (BlaR-R) и содержали сайты узнавания рестриктазами, которые необходимы для последующего клонирования фрагментов в экспрессирующий вектор. Олигонуклеотидные последовательности выбранного состава были синтезированы и очищены по заказу в “АртБиоТех” (Беларусь). Постановку ПЦР осуществляли с использованием фермента SmArtTaq-полимеразы в присутствии хлорида магния. Продукты амплификации анализировали электрофоретически.

Конструирование экспрессирующего вектора. В качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду pJC40, обеспечивающую транскрипцию клонированных генов в бактериальных клетках под контролем T7-промотора [29]. Особенностью этой плазмиды является наличие дополнительного фрагмента, кодирующего десять остатков гистидина, которые при трансляции локализуются в N-концевой части рекомбинантного полипепти-

да, что позволяет выполнить его очистку металлоаффинной хроматографией.

Рестрикцию вектора и амплифицированных фрагментов проводили с использованием ферментов эндонуклеаз XhoI и SmaI. Для лигирования фрагмента ДНК в исходный вектор pJC40 применяли фермент T4 ДНК-лигаза. Амплифицированные фрагменты ДНК и продукты рестрикции гибридных плазмид анализировали электрофоретически.

Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамм DH5 α . Трансформацию клеток выполняли в присутствии хлорида кальция. Далее клетки-трансформанты высевали на селективную среду. Селекцию гибридных клонов осуществляли, после посева рассеянных штрихом одиночных колоний клеток-трансформантов (от 5 до 12 клонов) на твердой питательной среде с последующим выделением плазмидной ДНК и ее рестрикционным анализом. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с использованием коммерческих наборов QIAprep Miniprep Kit ("Qiagen", Нидерланды), GeneJET Plasmid Miniprep Kit ("Thermo Fisher Scientific", США), Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit ("Jena Bioscience", Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Индукция синтеза рекомбинантного белка. Индукцию бактериальной культуры *E. coli* штамм BL21(DE3) проводили с использованием ИПТГ. Единичные колонии клеток *E. coli*, штамм BL21(DE3), трансформированные соответствующей гибридной плазмидой, выращивали при 37°C в питательной среде LB при постоянном перемешивании на шейкере до достижения культурой логарифмической фазы роста ($D_{600} = 0.3$). Затем вносили в среду ИПТГ в конечной концентрации 0.4 мМ и инкубировали в течение 3 ч. Клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, с 0.5 М NaCl. Анализировали бактериальный лизат электрофоретически в 15%-ном ПААГ.

Очистка целевого белка. Очистку рекомбинантного белка проводили методом металлохелатной аффинной хроматографии с использованием сорбента с иммобилизованными катионами Ni²⁺ ("Sigma-Aldrich", США) в условиях без применения денатурирующих агентов. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 10 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка.

Для приготовления лизата клетки *E. coli* осаждали центрифугированием при 2500 g в течение 10 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, содержащем 5 мМ имидазол и 0.5 М NaCl. Далее клеточную суспензию обрабатывали с помощью 5 циклов соникации при 20 кГц в течение 30 с на льду. После

обработки ультразвуком клеточные лизаты *E. coli* центрифугировали при 4000 g в течение 30 мин при +4°C. Супернатант, содержащий растворимые белки, собирали и наносили на колонку со скоростью 15–20 мл/ч. Затем колонку промывали 10 объемами связывающего буфера, содержащего 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, содержащий 5 мМ имидазол и 0.5 М NaCl, и далее 10 объемами промывочного буфера, содержащего 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, 20 мМ имидазол, 0.5 М NaCl. Элюцию связанного рекомбинантного белка проводили буферным раствором, содержащим 0.02 М трис-HCl, pH 7.5, 500 мМ имидазол, 0.5 М NaCl. Дополнительную очистку белка проводили с использованием колонки с гидроксипатитом ("Bio-Rad", США).

Полученные в процессе его очистки фракции белка, включая лизат клеток до и после обработки ультразвуком, осадок после УЗ-обработки клеточной суспензии, растворенный в мочеvine (конечная концентрация 6 М), хроматографические фракции до и после нанесения на колонку, а также препарат очищенного белка анализировали электрофоретически в 15%-ном ПААГ. Концентрацию целевого активного белка во всех перечисленных фракциях определяли разработанным биоаналитическим методом. Содержание очищенного белка контролировали также спектрофотометрически и по методу Бредфорда.

Получение поликлональных антител к BlaR-CTD и мечение их пероксидазой. Рекомбинантным белком BlaR-CTD из одной и той же охарактеризованной партии иммунизировали мышей линии BALB/c путем многократного подкожного введения с полным адъювантом Фрейнда по 50 мкг BlaR-CTD на одну инъекцию с интервалом в 14 сут. Через 7 дней после каждой повторной инъекции у животных отбирали сыворотку крови и анализировали динамику продукции антител путем детекции поликлональных антител к BlaR-CTD с помощью ИФА. Далее внутрибрюшинно прививали мышам последовательно 0.2 мл пристана, 50 мкг BlaR-CTD и 10⁵–10⁶ клеток карциномы Эрлиха с интервалом в 3–5 сут. Выделение поликлональных антител из полученной асцитической жидкости осуществляли последовательным осаждением альбумина каприловой кислотой и иммуноглобулинов сульфатом аммония. Концентрацию антител определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент экстинкции 1.35 г⁻¹ · л · см⁻¹.

Конъюгат полученных антител с высокоочищенной ($R_z \geq 3.0$) пероксидазой из корней хрена ("Диаэм", Россия) синтезировали путем окисления углеводов цепей фермента перйодатом натрия, присоединения иммуноглобулина с образованием основания Шиффа и стабилизацией аддукта вос-

становлением двойной связи борогидридом натрия.

Рецепторно-иммунная система сэндвич-ИФА—BlaR-CTD. В лунках микропланшета иммобилизовали конъюгат ампициллина с альбумином, полученным и охарактеризованным, как описано ранее [17], внесением во все лунки по 100 мкл раствора с концентрацией 0.5 мкг/мл и инкубации при 4–8°C в течение 18 ч. При выборе условий анализа использовали также растворы с концентрацией конъюгата 0.15 и 1.0 мкг/мл. Стабилизацию проводили внесением во все лунки по 150 мкл 0.05 М натрий-фосфатного буфера (НФБ), pH 7.0, содержащего 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20, 1 мг/мл БСА, 2% сахарозы, 0.01% эуксил К-100, и выдерживанием планшета при 4–8°C в течение 18 ч. Стандарты (калибровочные растворы) активного и охарактеризованного BlaR-CTD, готовили в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20, 1 мг/мл БСА, 0.01% эуксил К-100 в диапазоне концентраций 0.5–215 нг/мл. При проведении анализа в лунки вносили по 100 мкл калибровочных растворов с возрастающими концентрациями рецепторного белка или по 100 мкл исследуемых проб, предварительно разведенных тем же буферным раствором, и проводили инкубацию в течение 30 мин при температуре 25°C в термостате. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшет с использованием промывочного раствора (0.01 М НФБ, pH 7.0, 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20). На второй стадии вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата поликлональных антител к BlaR-CTD с пероксидазой с титром 1 : 5000. После инкубации при 25°C в течение 30 мин содержимое лунок удаляли и промывали планшет, как описано выше. В лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратного раствора, содержащего ТМБ и пероксид водорода (0.1 М натрий-цитратный буфер, pH 4.2, 3 мМ H₂O₂ и 1 мМ ТМБ) и инкубировали 15 мин при 20–25°C. Ферментативную реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 5%-ной H₂SO₄. Измеряли оптическую плотность при 450 нм (D₄₅₀) с помощью планшетного спектрофотометра Infinity M 200 Тесан (Австрия). Концентрацию активного BlaR-CTD в пробах определяли по калибровочной кривой, построенной в координатах D₄₅₀ (ось ординат, линейная) и концентрация BlaR-CTD в стандартах (ось абсцисс, логарифмическая), используя аппроксимацию $y = \lg(x) + b$.

Аналитическую чувствительность (предел обнаружения, минимальную достоверно измеряемую концентрацию) получали из калибровочного графика как абсциссу точки ($B_0 + 2 SD$).

Все эксперименты по исследованию лиганд-рецепторного связывания проводили не менее чем в трех повторах. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На калибро-

вочных графиках и в таблицах планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD).

Исследование стабильности связывающих свойств BlaR-CTD при хранении. Для установления условий сохранения активности BlaR-CTD при его применении в биоаналитических системах готовили пробы рецепторного белка в стабилизирующих буферных растворах, которые содержали либо только консервирующие добавки против бактериального роста, либо дополнительно включали стабилизирующие белковые и небелковые наполнители. Пробы белка разводили в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем консерванты — 0.03% проклин 300 и 0.015% BND (буфер № 2), или в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05 М твин-20, 1%-ный БСА, 1%-ный декстран 70, 10%-ный глицерин, 0.03%-ный проклин 300, 0.015%-ный BND (буфер № 1), или 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.1%-ный БСА, 1%-ную лактозу, 0.03%-ный проклин 300, 0.015%-ный BND (буфер № 3) и выполняли анализ.

Белок в указанных буферных растворах № 1 и № 2 выдерживали при температурах 4°C, –20°C или –70°C в течение 1–12 мес. и проводили контроль в периоды 0, 1, 3, 6, 12 мес. Также в качестве контроля применяли препарат лиофилизованного рецепторного белка в буфере № 3. Исследуемые пробы, хранившиеся при –20 и –70°C, готовили в аликвотах и анализировали после однократного размораживания. Количественное определение BlaR-CTD проводили методом сэндвич-ИФА—BlaR-CTD и рассчитывали концентрацию в пробах по калибровочной кривой. Остаточную активность рецепторного белка после хранения определяли как отношение концентраций этого белка в хранившихся и исходных пробах.

Частичная денатурация BlaR-CTD и связывание с лигандом и антителами. Для определения структурно-функциональной стабильности рецептора бета-лактамов проводили анализ его связывания с лигандом и антителами в системе сэндвич-ИФА—BlaR-CTD после воздействия на рецепторный белок факторов, способных нарушать вторичную и третичную структуры. Пробы BlaR-CTD выдерживали в течение 1 ч при температуре 25°C в средах, содержащих мочевины в диапазоне концентраций 1–10 М, гуанидингидрохлорид (1–6 М), ДДС (1–4%), а также в 0.1 М НФБ с pH 6.0 (контроль), 7.0, 8.0 и pH 12.0 или в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере с pH 3.0 и 5.0, или в 0.1 М карбонатном буфере с pH 10.0. Кроме того, проводили инкубации в течение 1 ч при температурах 25, 37, 55 и 100°C. Затем разводили пробы в 100 раз инкубационным раствором для нивелирования действия денатурантов и агрессивных сред на связывание рецептора с иммобилизованным ампициллином и растворенными антителами в

тест-системе сэндвич-ИФА—BlaR-CTD и выполняли анализ. Для оценки остаточной активности BlaR-CTD (%) средние значения концентрации рецептора в подвергнутых денатурирующим воздействиям пробах относили к среднему значению его концентрации в контрольной пробе.

Рецепторная система для определения бета-лактамов в микропланшетах. В лунках микропланшета иммобилизовали конъюгат ампициллина с альбумином, как описано выше. Калибровочные пробы, содержащие ампициллин, готовили в 0.05 М НФБ, pH 7.0, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05% Твин 20, 1 мг/мл БСА, 0.01%-ный экусил К-100 в диапазоне концентраций 0, 0.025–4 нг/мл. При проведении анализа в лунки вносили по 50 мкл калибровочных растворов или исследуемых проб и по 50 мкл раствора BlaR-CTD и проводили инкубацию в течение 30 мин при 25°C. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшет. На второй стадии вносили в лунки по 100 мкл раствора конъюгата поликлональных антител к BlaR-CTD с пероксидазой. Планшет инкубировали 30 мин при 25°C, затем содержимое лунок удаляли и промывали планшет. Далее проводили ферментативное окрашивание и измерение D_{450} , как описано выше. Рассчитывали соотношение V_i/V_0 в %, где V_0 — оптическая плотность в отсутствие антибиотика в растворе, V_i — оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций антибиотика в растворе. Калибровочные графики зависимости конкурентного связывания от концентраций пенициллина в калибровочных пробах строили в координатах: V_i/V_0 в % (ось ординат, линейная) и концентрация в нг/мл (ось абсцисс, логарифмическая). Значение минимальной достоверно измеряемой концентрации получали из калибровочного графика как абсциссу точки ($V_0 - 2SD$).

Рецепторная система для определения бета-лактамов на тест-полосках. На нитроцеллюлозную мембрану наносили реагенты с помощью автоматического диспенсера IsoFlow ("ImageTechnology", США). Аналитическую зону тест-полоски формировали путем нанесения конъюгата ампициллина из раствора с концентрацией 0.5 мг/мл, а в контрольной зоне иммобилизовали антивидовые антитела (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из раствора с концентрацией 0.2 мг/мл. Далее мембраны сушили на воздухе при температуре 20–25°C не менее 20 ч. Затем собирали их в мультимембранный композит вместе с подложкой для исследуемой пробы и впитывающей мембраной. Тест-полоски нареза-ли шириной 3.5 мм с помощью автоматического гильотинного нарезчика IndexCutter 1 ("A Point Technologies", США).

Наночастицы золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом

натрия по методу Френса, как описано [30]. Функционализацию наночастиц осуществляли путем адсорбции на них поликлональных антител к BlaR-CTD в концентрации 12 мкг/мл, выбранной по фотометрическим данным. Для проведения анализа в лунки инертного пластмассового микропланшета вносили иммобилизованный через антитела на золотых наночастицах BlaR-CTD и добавляли ампициллин в возрастающих концентрациях в диапазоне 0, 0.5–4.0 нг/мл. Далее реагенты выдерживали в течение 3 мин и в лунку помещали подготовленные тест-полоски. Хромотографию проводили в течение 10 мин и визуальное регистрировали окрашивание.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе представлен новый методический подход для мониторинга одновременно лиганд-связывающей активности и иммунореактивности рецептора бета-лактамов антибиотиков в процессах его гетерологической экспрессии, выделения и технологической обработки для применения в аналитических системах. Разработана система рецепторно-иммунного связывания для количественного определения BlaR-CTD с неповрежденными структурами связывающего центра и периферии макромолекулы. Метод исследован в ходе контроля выходов биологически активного белка на стадиях биопродуцирования и очистки, а также при оценке стабильности этого рецептора в различных условиях технологической обработки и хранения как базового реагента тест-систем на бета-лактамы антибиотиков.

Принцип метода и характеристика рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА—BlaR-CTD. Данная система позволяет в одном тесте количественно оценить две независимые биоспецифические реакции BlaR-CTD, включающие его взаимодействие за счет рецепторного сайта и иммунореактивных эпитопов. В ходе анализа рецепторный белок сначала связывается посредством своего активного центра с бета-лактамом антибиотиком, иммобилизованным в составе конъюгата с инертным белком на внутренней поверхности лунки полистирольного микропланшета. Затем экспонированный в раствор иммунореактивный фрагмент структуры связанного рецептора в роли антигена взаимодействует с очищенными поликлональными антителами к BlaR-CTD, конъюгированными с пероксидазой из корней хрена (рис. 1). Альтернативно для детекции BlaR-CTD в его комплексе с твердофазным бета-лактамом могут применяться немеченные первичные антитела с последующим прибавлением пероксидазного конъюгата антивидового иммуноглобулина. По калибровочной кривой, основанной на использовании интактного BlaR-CTD, рассчитывается концентрация ак-

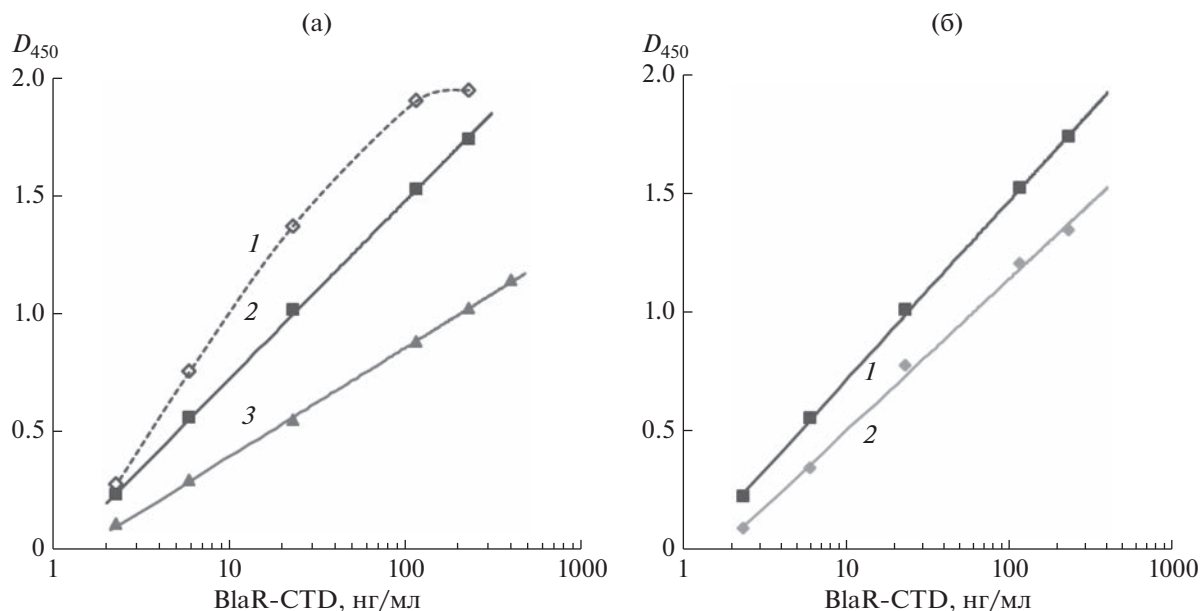


Рис. 2. Калибровочные графики гетерофазной рецепторно-иммунной системы сэндвич-ИФА—BlaR-CTD при различных концентрациях специфических реагентов. а Твердофазный конъюгат иммобилизован из раствора в концентрациях 1.0 (1), 0.5 (2) и 0.15 мкг/мл (3). б Концентрация антител к BlaR-CTD в анализе — 0.5 (1) и 0.25 (2) мкг/мл.

тивного рецептора в исследуемых пробах. Анализ занимает 1 ч 15 мин.

В работе получены все специфические компоненты и разработана конструкция сэндвич-ИФА—BlaR-CTD. Выбраны оптимальные концентрации реагентов для иммобилизации в лунках микропланшета и для взаимодействия в растворе с целью обеспечения наилучших показателей связывания и чувствительности анализа. Показано, что 0.5 мкг/мл является оптимальной концентрацией конъюгата в растворе для иммобилизации на твердой фазе (рис. 2а). Видно, что при увеличении содержания конъюгата на твердой фазе (раствор 1.0 мкг/мл) калибровочный график быстрее выходит на плато и таким образом сужается диапазон определяемых концентраций, соответствующий прямолинейному участку. При уменьшении плотности покрытия лунок конъюгатом ампициллина (раствор 0.15 мкг/мл) наблюдаются низкие значения связывания в единицах оптической плотности. Выбрана также оптимальная концентрация антител к BlaR-CTD на второй стадии анализа (рис. 2б). При увеличении содержания антител наблюдается постепенное увеличение связывания и соотношения значений сигнал/фон для калибровочного графика.

Диапазон достоверно определяемых концентраций активного BlaR-CTD составляет 5–215 нг/мл. Аналитическая чувствительность полностью соответствует назначению системы и составляет 2 нг/мл. Коэффициент вариации результатов определений не превышает 7%. Для обеспечения

практического применения разработанной системы экспериментально установлены способы долговременной стабилизации всех ее компонентов. Далее проведена апробация системы сэндвич-ИФА—BlaR-CTD в процессах экспрессии и очистки BlaR-CTD. С ее помощью исследовано влияние температуры и продолжительности хранения, а также различных физико-химических факторов на лигандсвязывающую и антигенную активность рецепторного белка.

Получение рекомбинантного белка BlaR-CTD.

Для биосинтеза рекомбинантного карбокситерминального фрагмента пенициллинсвязывающего рецептора использовали экспрессирующий вектор pJC 40 и бактериальный штамм *E. coli* BL21 (DE3). Плазмидный вектор pJC 40 широко используется для эффективной и специфической суперэкспрессии клонированных генов под контролем T7-промотора (рис. 3а). Количество экспрессируемого продукта может составлять до 10% от общего клеточного белка. Вектор содержит гистициновый участок, который становится частью N-конца экспрессируемого полипептида. Наличие последовательности, кодирующей 10 остатков гистидина, позволяет осуществлять очистку рекомбинантного белка BlaR-CTD аффинной металлохеллатной хроматографией.

Для синтеза фрагмента ДНК, кодирующего карбокситерминальный пенициллинсвязывающий рецептор, была подобрана и искусственно синтезирована пара олигонуклеотидов BlaR-F и BlaR-R, ограничивающая фрагмент генома *Bacil-*

lus licheniformis (GenBank, CP034569) с 1036 по 1800 н.о. В структуру праймеров были дополнительно включены сайты для узнавания специфическими рестриктирующими эндонуклеазами XhoI и SmaI и для дальнейшего встраивания синтезированного фрагмента в клонирующий вектор pJC40.

Предварительно осуществляли накопление бактериальной культуры *Bacillus licheniformis* В-80541, выделение бактериальной ДНК и постановку ПЦР на полученной ДНК-матрице. В результате был получен специфический фрагмент размером 782 п.о. (рис. 3б, дорожка 8) — полный ампликон, включающий сайты для клонирования. Далее данный фрагмент использовали для клонирования в экспрессирующий вектор pJC40. На рис. 3а представлены схематическая карта экспрессирующего вектора и электрофореграмма рестрикционного анализа плазмидной ДНК pJC40/ BlaR-CTD. Показано, что обработка рестриктазами XhoI и SmaI делит полученную плазмидную ДНК на 2 фрагмента, один из которых аналогичен исходному вектору (2402 п.н.), а второй фрагмент (782 п.н.) содержит специфическую вставку, кодирующую рецептор BlaR-CTD (рис. 3б, дорожки 1–7). Таким образом, в результате генно-инженерных манипуляций получена рекомбинантная плазмидная ДНК pJC40/ BlaR-CTD.

Для экспрессии BlaR-CTD полученной плазмидой трансформировали бактериальную культуру пермиссивных клеток *E. coli*, штамм BL21 (DE3). Оптимизация процесса получения рекомбинантного рецептора по таким параметрам, как условия подготовки “компетентных” клеток *E. coli*, количество индуктора в среде и время индукции, температура культивирования, позволила достигнуть высокой продукции белка.

Эффективность экспрессии оценивали по интенсивности соответствующих зон при электрофоретическом анализе (рис. 4). Так, в лизате продуцента (клетки, содержащие соответствующую рекомбинантную плазмиду) наблюдалась экспрессия полипептида и присутствие мажорного белкового продукта с молекулярной массой в области 25 кДа (рис. 4, дорожки 1, 2) в отличие от контрольного лизата клеток *E. coli*, штамм BL21 (DE3) без плазмиды, где эта полоса отсутствовала (рис. 4, дорожка 5).

Для получения рекомбинантного рецепторного белка, максимально очищенного от клеточных белков, были использованы металл-хелатная хроматография и последующая хроматография на гидроксиапатите. Обе хроматографии проводили в нативных условиях для сохранения структурно-функциональных свойств BlaR-CTD. Для дезинтеграции целевого белка клеточную суспензию обрабатывали 5 циклами соникации. Электрофоретический анализ фракций (рис. 4) рекомбинант-

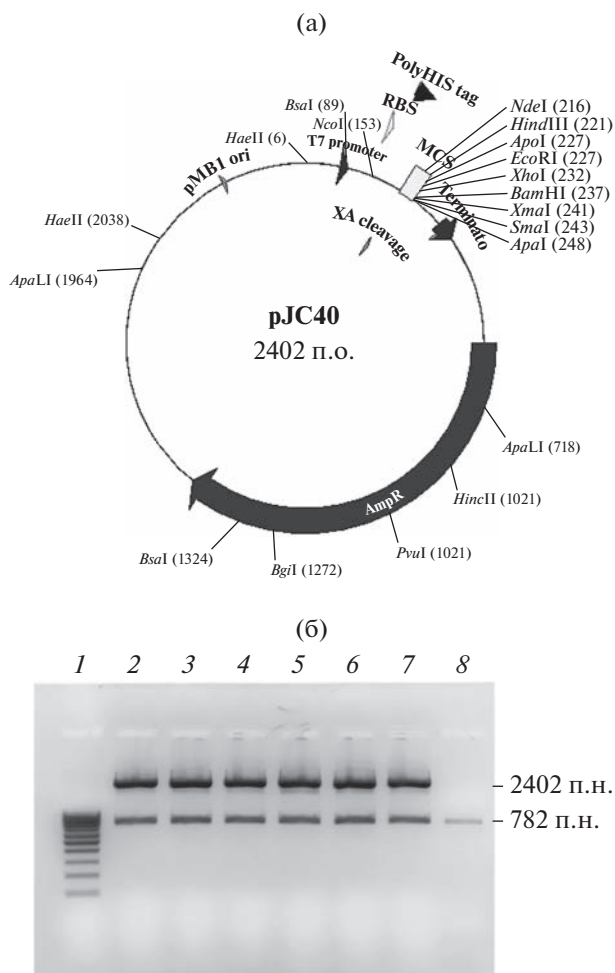


Рис. 3. Схематическая карта плазмидного вектора pJC40 (а) и электрофореграмма продуктов рестрикции рекомбинантной плазмиды pJC40/BlaR-CTD (б): 1 — маркер молекулярных масс; 2–7 — продукты рестрикции плазмидной ДНК по сайтам XhoI и SmaI, выделенной из гибридных клонов клеток DH5α/pJC40/BlaR-CTD; 8 — ампликат, полученный с парой праймеров, ограничивающих область BlaR-CTD.

ного полипептида показал, что фракция элюции (дорожка 9) содержит белок, соответствующий молекулярной массе 25 кДа, и при этом отсутствуют фоновые клеточные белки. Полученный белок характеризовался повышенной электрофоретической подвижностью, так как теоретически рассчитанная молекулярная масса продуцируемого BlaR-CTD составляет 32.22 кДа. Это подтвердили результаты MALDI-TOF, согласно которым полученный BlaR-CTD имел молекулярную массу 32.32 ± 0.06 кДа (рис. 5а). Дополнительная очистка хроматографией на гидроксиапатите позволила сконцентрировать белок, перевести его в буферный раствор без имидазола и достичь чистоты продукта не менее 95% (рис. 5б).

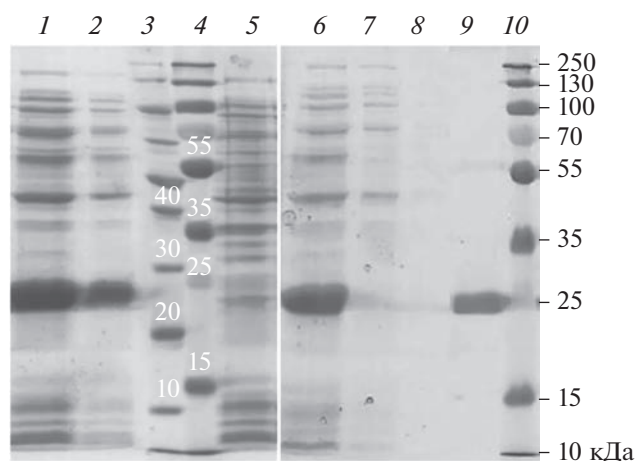


Рис. 4. Электрофоретический анализ фракций биосинтеза и выделения рекомбинантного рецептора BlaR-CTD. 1, 2 – исходный лизат клеток, экспрессирующих рецептор BlaR-CTD; 3, 4, 10 – маркеры молекулярных масс в кДа; 5 – лизат клеток *E. coli*, штамм BL21, не содержащих экспрессирующий вектор; 6, 7 – бактериальный лизат до и после проведения металлохелатной хроматографии, соответственно; 8 – фракция, полученные при промывке металлоаффинной колонки после связывания целевого белка; 9 – фракция элюции.

Этот препарат был охарактеризован далее как основной реагент биоаналитических систем для определения бета-лактамов антибиотиков. Перед этим его использовали для иммунизации лабораторных мышей с целью быстрого получения

специфических поликлональных антител против BlaR-CTD.

Определение содержания BlaR-CTD во фракциях при его гетерологической экспрессии и хроматографической очистки. Применение разработанной тест-системы сэндвич-ИФА–BlaR-CTD позволило провести специальное исследование содержания BlaR-CTD во фракциях при его получении в чистом виде.

Во всех исследованных пробах специфическим методом измерялся именно целевой белок (табл. 1). В анализе использовали следующие фракции: супернатант LB среды, исходный лизат клеточной суспензии, лизат клеток после УЗ (супернатант и осадок), элюат металлохелатной хроматографии, фракции с колонки после нанесения образца и после промывки колонки.

Известно, что некоторые рекомбинантные белки при экспрессии в гетерологичных системах способны к неспецифической агрегации и формированию “телец включения”. Поэтому мы определяли содержание рецептора в растворимой и нерастворимой фракциях после сонации клеток. При этом для получения растворимого белкового препарата использовали раствор мочевины.

Установлено, что основная фракция наработанного белка находится в клетках (88%), и часть белка присутствует в тельцах включения (12%). При работе с клетками нарабатывается около 2 мг рецепторного белка на 200 мл среды. Измерения

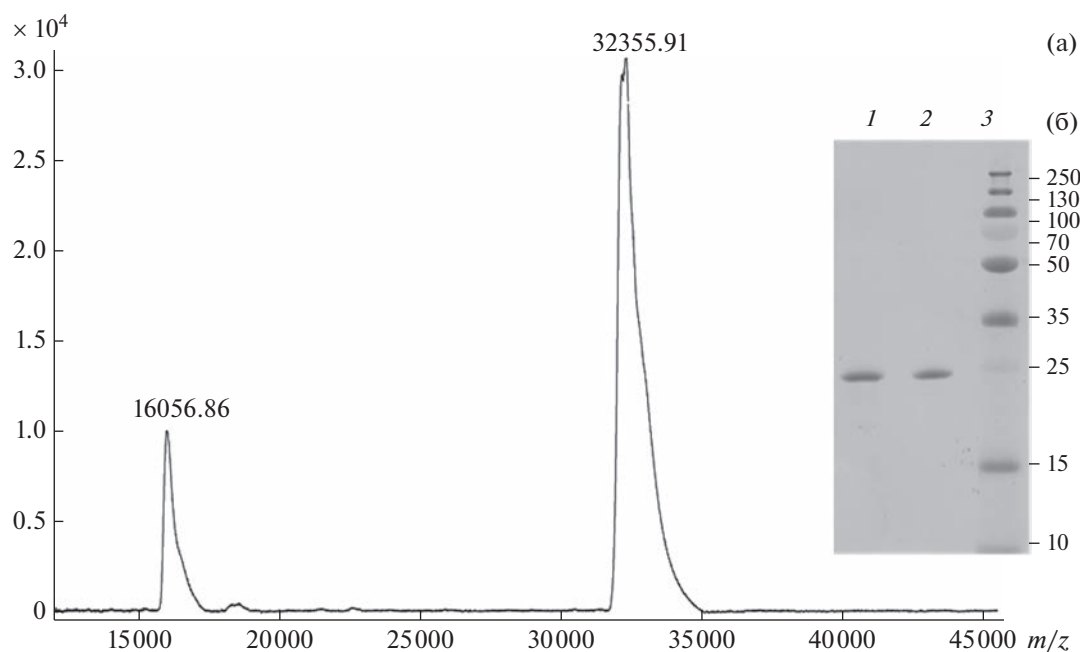


Рис. 5. Спектр MALDI-TOF (а) и электрофореграмма (б) очищенного рецепторного белка BlaR-CTD. 1–2 – препарат очищенного BlaR-CTD, 3 – маркер молекулярных масс в кДа.

Таблица 1. Характеристика стадий получения рекомбинантного BLaR-CTD

№ п/п	Фракции, получаемые при выделении и очистке	Содержание BLaR-CTD*, мкг	Степень чистоты, %	Выход BLaR-CTD, %
1	Супернатант LB среды	5 ± 1	—	—
2	Лизат клеточной суспензии	2400 ± 50	29 ± 1	—
3	Лизат клеток после УЗ-обработки, супернатант	2750 ± 50	33 ± 2	100.0
4	Лизат клеток после УЗ-обработки; осадок, растворенный в 6М мочеvine	300 ± 20	—	—
5	Неадсорбированная фракция металл-хелатной хроматографии	25 ± 5	—	—
6	Промывка металлохелатной колонки	30 ± 5	—	—
7	Элюат имидазолом в металл-хелатной хроматографии	1950 ± 50	95 ± 1	70.9

* Измерения содержания BLaR-CTD в различных фракциях с использованием системы сэндвич-ИФА—BLaR-CTD представлены в расчете на 200 мл среды. “—” — обозначены фракции, в которых характеристики BLaR-CTD не определяли и/или не рассчитывали.

BLaR-CTD в различных фракциях с использованием сэндвич-ИФА—BLaR-CTD представлены из расчета на 200 мл среды. В самой LB среде целевой белок практически отсутствовал (табл. 1). В исходном лизате присутствовало 2.4 ± 0.05 мг белка, а после обработки УЗ его содержание составило 2.75 ± 0.05 мг. Выход BLaR-CTD после аффинной хроматографии составлял около 70%. Показано, что во фракциях, собранных после нанесения образца на металл-хелатную колонку, и фракциях, полученных после промывки этой колонки, целевой белок также практически отсутствовал. Таким образом, согласно данным рецепторно-иммунного анализа разработана эффективная схема получения рекомбинантного BLaR-CTD.

Характеристика поликлональных антител к BLaR-CTD. В работе получены антитела к BLaR-CTD и исследованы их иммунохимические свойства в отношении интактного BLaR-CTD и его мутантной формы BLaR-CTD-M (I188K/S19C/G24C), переданной нам из лаборатории, в которой мутантный белок был ранее получен и всесторонне охарактеризован [26, 27]. Установлена способность поликлональных антител идентично выявлять обе формы рецептора бета-лактамов в составе их твердофазных комплексов с ампициллином. Калибровочные графики сэндвич-ИФА—BLaR-CTD с применением в качестве стандартов рецепторных белков дикого и мутантного типов представлены на рис. 6.

Мониторинг активности BLaR-CTD при различных температурно-временных условиях хранения. Для биоаналитического применения полученного рецептора как базового реагента тест-систем контроля содержания остаточных количеств бета-лактамов антибиотиков в пищевой продукции изучена его стабильность при хранении в течение 1–12 мес. при температурах -70 , -20°C или 4°C , в различных буферных средах, в том числе со

стабилизирующими наполнителями (табл. 2). Показано, что наиболее полно связывающие свойства BLaR-CTD сохраняются при его сублимационной сушке и выдерживании в виде лиофилизованного препарата. Активность BLaR-CTD оставалась прежней или лишь незначительно падала при его хранении в буферных растворах, содержащих белковые наполнители и глицерин, в температурном диапазоне от -70 до 4°C . В случае выдерживания этого белка в буферном растворе без наполнителей оптимальным является замораживание при -70°C , при этом допускается двукратное оттаивание/замораживание. В таких

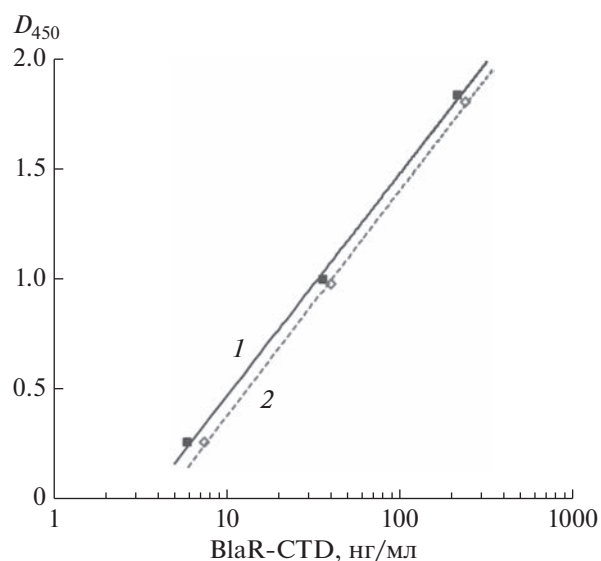


Рис. 6. Взаимодействие BLaR-CTD (1) и его мутантной формы BLaR-CTD-M (2) с твердофазным бета-лактамом и меченными пероксидазой поликлональными антителами к BLaR-CTD в системе сэндвич-ИФА—BLaR-CTD.

Таблица 2. Активность BLaR-CTD при различных условиях и продолжительности хранения

№	Условия хранения		Активность, %			
	Среда	t , °C	1 мес	3 мес	6 мес	12 мес
1	Буфер 1	4	97 ± 1	93 ± 2	89 ± 2	88 ± 2
2		–18	100 ± 1	99 ± 2	99 ± 2	96 ± 2
3		–70	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
4	Буфер 2	+4	84 ± 2	81 ± 2	80 ± 2	81 ± 2
5		–18	86 ± 3	70 ± 3	55 ± 3	50 ± 3
6		–70	91 ± 2	89 ± 2	88 ± 2	88 ± 2
7	Буфер 3	Лиофилизация	100 ± 1	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 1

условиях активность BLaR-CTD составляла 95–100%.

Стабильность BLaR-CTD при денатурирующих воздействиях. Лигандсвязывающие свойства и иммунореактивность BLaR-CTD могут меняться в агрессивных средах, моделирующих условия технологических обработок в процессах приготовления его реагентных форм. Поэтому перед применением в рецепторно-иммунных тест-системах на антибиотики необходимо оценивать запас структурно-функциональной прочности данного белка. Для этого BLaR-CTD инкубировали в растворах с различными концентрациями денатурирующих агентов или при повышенных температурах. Затем пробы разводили буферным раствором для нивелирования действия денатурантов и при комнатной температуре измеряли в них концентрации биологически активного белка тест-системой сэндвич-ИФА–BLaR-CTD.

Установлена достаточно высокая устойчивость BLaR-CTD к денатурации. При воздействии хаотропных агентов происходило постепенное, но незначительное снижение связывающих свойств рецепторного белка (рис. 7а, 7б). Так, даже в условиях 6 М мочевины или 4 М гуанидингидрохлорида белок сохранял 72–75% своей лигандсвязывающей активности и иммунореактивности. Даже в присутствии 10 М мочевины не происходило полной денатурации, и остаточная активность белка составила 45%. В то же время после воздействия 6 М гуанидингидрохлорида определялось лишь 12% активного BLaR-CTD. В растворах ДДС с концентрациями 1–4% происходила инактивация 90% присутствующего в пробах рецепторного белка.

Найдено, что в растворах с pH 5–7 максимально сохранялись способности BLaR-CTD взаимодействовать с твердофазным бета-лактамом и растворимыми антителами (рис. 7в). Однако при выдерживании в среде с pH 3 наблюдалось подавление связывающих свойств белка, и подвергнутый такой обработке BLaR-CTD характеризовался остаточной активностью 37%. Увеличение pH

среды с 7 до 12 приводило к постепенному уменьшению биоактивности BLaR-CTD до значения 58%.

Анализ стабильности при тепловой обработке в диапазоне 25–100°C показал, что выдерживание при температуре 37°C уже приводило к изменению активности рецепторного белка, а в результате инкубации при 55°C в течение 1 ч его остаточная активность составила только 14% (рис. 7г). Исходя из полученных данных, можно было сделать выводы об оптимальных условиях функционирования BLaR-CTD *in vitro*. Для сохранения биоактивности рецептора предпочтительным является его применение и хранение в буферных растворах с pH в диапазоне 5–7. При выполнении биоанализа следует проводить инкубации при температуре около 25°C. В процессах выделения, очистки и приготовления реагентных форм BLaR-CTD можно использовать растворы мочевины или гуанидингидрохлорида в соответствующих концентрациях до 6 и 4 М включительно.

Рецепторная тест-система для определения бета-лактамов. Используя BLaR-CTD в качестве основного биореагента, мы разработали систему непрямого рецепторно-иммуноферментного анализа бета-лактамовых антибиотиков. Принцип анализа заключается в конкурентном взаимодействии рецептора с бета-лактамом, адсорбированным в лунках микропланшета в составе конъюгата с инертным белком, и свободными бета-лактамами в жидкой фазе. Выявление иммобилизованного комплекса лиганд–рецептор осуществляли посредством специфических антител к BLaR-CTD, меченных пероксидазой. В результате экспериментов по оптимизации условий лиганд–рецепторного взаимодействия (содержание бета-лактамов на твердой и в жидкой фазах, концентрация BLaR-CTD в растворе, pH и ионная сила среды, температура) получены аналитические характеристики системы, которые отражены в калибровочной кривой, представленной на рис. 8а. В калибровочных пробах находился ампициллин в возрастающих концентрациях. Рабочий диапазон

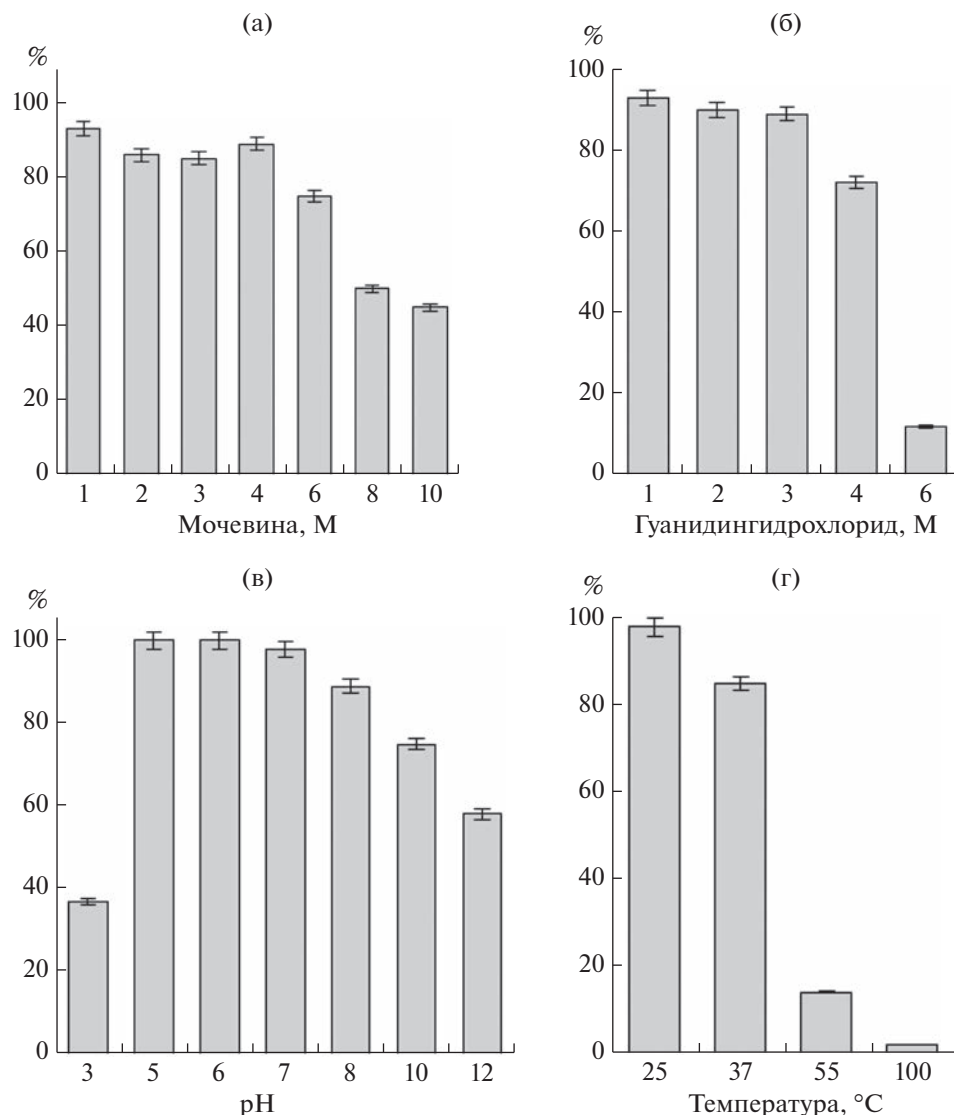


Рис. 7. Активность BLAR-CTD после воздействия на белок некоторых химических и физических факторов.

анализа составлял 0.05–4.0 нг/мл при $IC_{50} = 0.28 \pm \pm 0.01$ нг/мл ($n = 3$). Аналитическая чувствительность 0.02 нг/мл в отношении ампициллина превышала показатели, представленные в литературе [8, 15]. Разработанная конструкция может стать прототипом набора реагентов для рецепторно-иммуноферментного анализа бета-лактамов в пищевой продукции животного происхождения.

BLAR-CTD в рецепторнохроматографическом анализе бета-лактамов. Тест-системы экспрессного анализа на тест-полосках широко востребованы, благодаря скорости и простоте выполнения, высокой производительности и возможности проведения анализа вне лаборатории без сложного оборудования. В работе были исследованы лигандсвязывающие свойства и иммунореактивность полученного рецепторного белка BLAR-CTD в конструкции рецепторно-хроматографической тест-системы. В хо-

де анализа тест-полоска помещалась в коллоидный раствор, содержащий иммобилизованный рецептор и стандартные пробы антибиотика. При движении раствора вдоль полоски к впитывающей верхней мембране происходило взаимодействие твердофазного конъюгата ампициллина с меченным золотом BLAR-CTD в аналитической зоне и связывание в контрольной зоне адсорбированных на мембране антивидовых антител с антителами к BLAR-CTD в составе детектирующего комплекса на золотых наночастицах. Аналитический процесс состоял из одной стадии. Оценка результатов заключалась в визуальном контроле наличия или отсутствия окрашивания в аналитической и контрольной зонах тест-полоски (рис. 8б). Установлено, что порог визуальной детекции ампициллина составлял 1–2 нг/мл, что указывало на пригодность тест-системы для анализа этой вете-

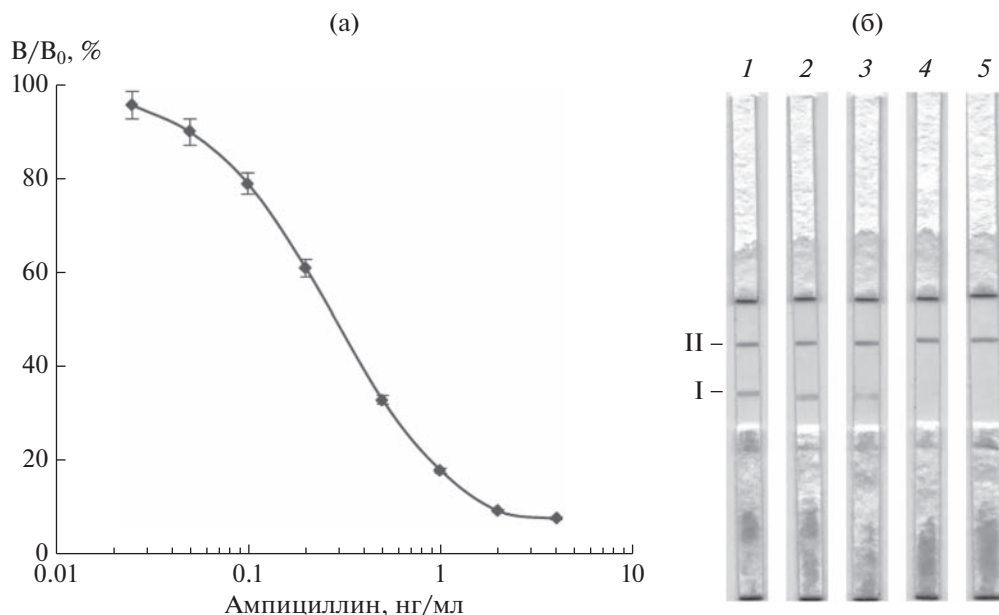


Рис. 8. Взаимодействия BLaR-CTD с конъюгатом ампициллина, иммобилизованным в лунках микропланшета (а) или в аналитической зоне тест-полоски (б), при возрастающих концентрациях свободного ампициллина в жидкой фазе в модельных системах рецепторного анализа. (б) Ампициллин в концентрациях 0 (1), 0.5 (2), 1 (3), 2 (4), 4 (5) нг/мл. I и II – аналитическая и контрольная зоны тест-полоски.

ринарной субстанции в продуктах питания и позволяло выявлять ампициллин в концентрациях даже ниже значений его максимально допустимого уровня в продуктах питания [5, 6]. Отметим, что найденное значение предела обнаружения лежало также ниже аналогичных значений, представленных в литературе для тест-систем на основе антител и других пенициллинсвязывающих белков [7, 8, 15, 26, 31].

Описанная модельная система рецепторно-хроматографического анализа на бета-лактамы при проведении дальнейших исследований с использованием широкого круга антибиотиков этого класса и различных пищевых матриц может стать практическим аналитическим средством экспрессного контроля биобезопасности продуктов питания.

Таким образом, в результате работы получен в чистом виде рекомбинатный микробный белок BlaR-CTD, связывающий бета-лактамы антибиотиков и взаимодействующий со специфическими антителами в двух форматах тест-систем на бета-лактамы. С помощью разработанной системы рецепторно-иммунного анализа исследована устойчивость его активности к лигандам и антителам в процессах экспрессии, очистки и биоаналитического применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сазыкин И.С., Хмелевцова Л.Е., Селиверстова Е.Ю., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 1. С. 24–35. <https://doi.org/10.31857/S0555109921010335>
2. Kantiani L., Farre M., Barcelo D. // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. № 6. P. 729–744. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.005P>
3. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. // Trends Anal. Chem. 2014. V. 55. P. 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.007>
4. Ahmed S., Ning J., Peng D., Chen T., Ahmad I., Ali A., Lei Z., Shabbir M.A., Cheng G., Yuan Z. // Food Agric. Immunol. 2020. V. 31. №. 1. P. 268–290. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707171>
5. Decision of the EEC Board of February 13, 2018 N 28. https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01217013/clcd_15022018_28.
6. European Commission. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. // Official Journal of the European Union. 2010. L 15/10. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/-files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.
7. Strasser A., Usleber E., Schneider E., Dietrich R., Bürk C., Märklbauer E. // Food Agric. Immunol. 2003. V. 15. № 2. P. 135–143. <https://doi.org/10.1080/09540100400003493>
8. Cliquet P., Goddeeris B.M., Okerman L., Cox E. // Food Agric. Immunol. 2007. V. 18. № 3–4. P. 237–252. <https://doi.org/10.1080/09540100701802908>
9. Bremus A., Dietrich R., Dettmar L., Usleber E., Märklbauer E. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 403. № 2. P. 503–515. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5750-z>
10. Jiao S.N., Wang P., Zhao G.X., Zhang H.C., Liu J., Wang J.P. // J. Environ. Sci. Health. B. 2013. V. 48. № 6. P. 486–494. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761908>

11. Kuprienko O.S., Serchenya T.S., Vashkevich I.I., Harbachova I.V., Zilberman A.I., Sviridov O.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. № 1. P. 105–114. <https://doi.org/10.1134/S106816202201006X>
12. Chambers S.J., Wyatt G.M., Morgan M.R. // Anal Biochem. 2001. V. 288. № 2. P. 149–155. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4883>
13. Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A. // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. № 5. P. 673–691. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
14. Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. № 3. P. 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
15. Zeng K., Zhang J., Wang Y., Wang Z.H., Zhang S.X., Wu C.M., Shen J.Z. // Biomed. Environ. Sci. 2013. V. 26. № 2. P. 100–109. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004>
16. Chen Y., Wang Y., Liu L., Wu X., Xu L., Kuang H., Li A., Xu C. // Nanoscale. 2015. V. 7. № 39. P. 16381–16388. <https://doi.org/10.1039/c5nr04987c>
17. Serchenya T.S., Harbachova I.V., Sviridov O.V. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. № 1. P. 85–95. <https://doi.org/10.1134/S1068162022010125>
18. Moon T.M., D'Andréa E.D., Lee C.W., Soares A., Jakoncic J., Desbonnet C. et al. // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 48. P. 18574–18584. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006052>
19. Zhu Y.F., Curran I.H., Joris B., Ghuyssen J.M., Lampen J.O. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 2. P. 1137–1141. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.1137-1141.1990>
20. Joris B., Ledent P., Kobayashi T., Lampen J.O., Ghuyssen J.M. // FEMS Microbiology Letters. 1990. V. 70. № 1. P. 107–113. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90111-3)
21. Duval V., Swinnen M., Lepage S., Brans A., Granier B., Franssen C., Frère J.-M., Joris B. // Mol. Microbiol. 2003. V. 48. № 6. P. 1553–1564. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03520.x>
22. Kerff F., Charlier P., Colombo M.-L., Sauvage E., Brans A., Frère J.-M., Joris B., Fonze E. // Biochemistry. 2003. V. 42. № 44. P. 12835–12843. <https://doi.org/10.1021/bi034976a>
23. Golemi-Kotra D., Cha J.Y., Meroueh S.O., Vakulenko S.B., Mobashery S. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 20. P. 18419–18425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300611200>
24. Peng J., Cheng G., Huang L., Wang Y., Hao H., Peng D., Liu Z., Yuan Z. // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. № 27. P. 8925–8933. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5>
25. Ning J., Ahmed S., Cheng G., Chen T., Wang Y., Peng D., Yuan Z. // J. Biological Engineering. 2019. V. 13. № 1. P. 27–43. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0157-4>
26. Lia Y., Xua X., Liua L., Kuanga H., Xua L., Xu C. // Analyst. 2020. V. 145. № 9. P. 3257–3265. <https://doi.org/10.1039/d0an00421a>
27. Li Y., Liu L., Xu C., Kuang H., Sun L. // Sci. China Mater. 2021. V. 64. № 8. P. 2056–2066. <https://doi.org/10.1007/s40843-020-1578-0>
28. Wang G., Zhang H.C., Liu J., Wang J.P. // Anal. Biochem. 2019. V. 564–565. P. 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.10.017>
29. Clos J., Brandau S. // Protein Expr. Purif. 1994. V. 5. № 2. P. 133–137. <https://doi.org/10.1006/prep.1994.1020>
30. Frens G. // Nature Physical Science. 1973. V. 241. № 105. P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
31. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 6. P. 627–634. <https://doi.org/10.1134/S0003683811060032>

A Method for the Quantitative Determination of the Active Receptor of Beta-lactam Antibiotics BlaR-CTD for Bioanalytical Applications

T. S. Serchenya^{a, *}, P. A. Semizhon^b, E. P. Schaslionak^b, I. V. Harbachova^a,
I. I. Vashkevich^a, and O. V. Sviridov^a

^a Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Belarus

^b Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, 220114 Belarus

*e-mail: serchenya@tut.by

A sandwich bioassay for the quantitative determination of the recombinant beta-lactam receptor BlaR-CTD possessing ligand binding activity and immunoreactivity has been developed. In the bioassay system, BlaR-CTD present in a biological liquid or standard sample binds via its receptor site to ampicillin immobilized in a microplate well and interacts through the epitopes of its peripheral structure with specific polyclonal antibodies. The analytical sensitivity of the method proved to be 2 ng/mL, and its concentration range was 5–215 ng/mL. In the processes of heterologous expression, isolation and reagent forms preparation, the biological activity of BlaR-CTD was monitored and its stability was evaluated. High purity recombinant beta-lactam receptor BlaR-CTD was obtained. The protein was shown to have a sufficiently high resistance to denaturation by chaotropic agents (urea and guanidine hydrochloride), and it was stable over a wide pH range. Also, we proposed the constructions and procedures of competitive bioassays for beta-lactam antibiotics using microplates (analytical sensitivity – 0.02 ng/mL, IC₅₀ = 0.28 ng/mL) or chromatographic test-strips (detection limit 1–2 ng/mL), which are based on the receptor and antigenic properties of BlaR-CTD.

Keywords: beta-lactam antibiotics receptor, BlaR-CTD, beta-lactam, immunoassay, receptor assay

УДК 543.645:57.083.3

РАЗРАБОТКА ПОЛЯРИЗАЦИОННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИММУНОАНАЛИЗА СУЛЬФАТИАЗОЛА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ МЕДА

© 2023 г. И. С. Нестеренко¹, О. Д. Гендриксон², Н. И. Смирнова²,
С. А. Еремин³, Д. В. Сотников², *

¹Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, 123022 Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2022 г.

После доработки 15.08.2022 г.

Принята к публикации 02.09.2022 г.

Разработан поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) для выявления остаточных количеств антибактериального препарата сульфатиазола из класса сульфаниламидов, применяемого для профилактики и лечения инфекционных заболеваний пчел. Определены условия проведения ПФИА, обеспечивающие достижение высоких аналитических характеристик. Продолжительность ПФИА составляла 5 мин, предел обнаружения — 3 нг/мл. Показана высокая селективность ПФИА по отношению к сульфатиазолу; коэффициенты перекрестного реагирования для других сульфаниламидов не превышали 3%. Подтверждена эффективность обнаружения сульфатиазола разработанным ПФИА в пробах меда, для тестирования которых выбрана оптимальная методика пробоподготовки. Полученные результаты демонстрируют возможности использования разработанного иммуноанализа для быстрого и чувствительного контроля качества и безопасности меда.

Ключевые слова: сульфатиазол, антибиотики, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ, контроль качества продуктов питания, мед

DOI: 10.31857/S0555109923010051, **EDN:** CUSONF

Пчеловодство — важная отрасль сельского хозяйства, обеспечивающая потребителей продуктами с уникальными свойствами. Из видов пчеловодческой продукции наибольший интерес представляет мед, источник разнообразных биологически активных соединений [1]. Обладая высокой пищевой ценностью и отличными вкусовыми качествами, мед востребован и как индивидуальный продукт, и как компонент различных композитов [2].

В пчеловодстве для профилактики инфекций пчел широко применяется обработка пчел антибиотиками, которые останавливают распространение патогенов и предотвращают вспышки инфекций [3, 4]. Однако такие обработки приводят к контаминации меда и другой продукции пчеловодства антибиотиками. Употребление в пищу меда, содержащего остатки антибактериальных препаратов, может вызвать аллергические реакции, кишечные расстройства, нарушения обмена веществ и другие нежелательные последствия для

здоровья, а также способствовать распространению антибиотикорезистентных патогенов [5, 6].

К широко применяемым в пчеловодстве антибактериальным препаратам относятся сульфаниламиды, в частности, сульфатиазол (СТ) (рис. 1а), который используется при профилактических обработках против гнильца — болезни расплода пчел [6]. В странах Евразийского экономического союза и других странах максимально допустимый уровень (МДУ) этого соединения и других сульфаниламидов в различных продуктах питания составляет 100 мкг/кг [7–9]. В меде наличие сульфаниламидов не допускается.

Обеспечение качества меда неотъемлемо связано с измерениями содержания в нем различных токсикантов, включая антибактериальные препараты. Для контроля за содержанием сульфаниламидов в продуктах питания применяются такие инструментальные методы, как высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией [10, 11], электрохими-

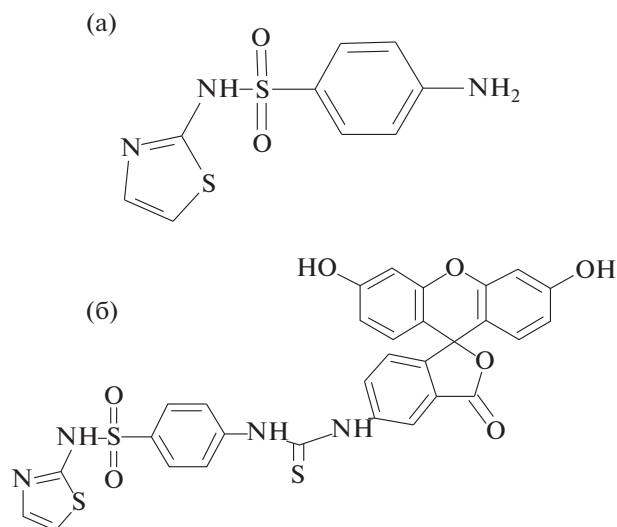


Рис. 1. Структура сульфатазиола (а) и его конъюгата с флуоресцеинизотиоцианатом (б).

ческие [12] и микробиологические [13] методы, капиллярный электрофорез [14] и др. Однако реализация этих методов сопряжена с рядом трудностей, обусловленных необходимостью дорогостоящего оборудования и высокой квалификацией персонала, многостадийной пробоподготовкой, низкой производительностью и др.

Большое значение приобретает разработка высокочувствительных и специфичных методов, позволяющих быстро и с минимальными затратами проводить скрининговый контроль наличия контаминантов в большом числе проб. К таким методам относятся иммунохимические методы анализа [15–17], в том числе гомогенный метод поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) [18, 19]. При проведении ПФИА молекулы выявляемого соединения—антигена, содержащиеся в тестируемой пробе, конкурируют за связывание со специфическими антителами с трейсером — производным антигена, модифицированным флуорофором. При облучении реакционной смеси плоскополяризованным светом, возбуждающим флуорофор, сохранение поляризации излучаемым светом зависит от того, находится ли трейсер в комплексе с антителами. Соответственно, степень деполяризации излучения отражает содержание антигена в пробе. Детектируемый сигнал изменяется непосредственно в момент иммунного взаимодействия и может быть зарегистрирован в режиме реального времени. К достоинствам ПФИА относятся отсутствие длительных диффузионно-зависимых взаимодействий между иммобилизованными и находящимися в растворе реагентами и многостадийных инкубаций с разделением прореагировавших и непрореагировавших компонентов. ПФИА характеризуется не только высо-

кой чувствительностью и быстротой тестирования, но и отсутствием необходимости в сложной пробоподготовке [18].

В настоящее время в литературе представлены разработки ПФИА для определения некоторых соединений из группы сульфаниламидов — сульфаметазина, сульфадиазина и сульфаниламида — в молоке, мясе курицы, сточных водах [20–22]. Однако до сих пор не рассматривалось применение ПФИА для контроля меда на наличие сульфаниламидов, в том числе сульфатазиола.

Цель работы — создание методики экспрессного выявления СТ с помощью ПФИА и ее апробация при тестировании проб меда.

МЕТОДИКА

Реактивы и оборудование. В работе использовали сульфаниламиды (СТ, сульфаметазин, сульфадиазин, сульфамеразин, сульфаклорпиридазин, сульфаметоксазол, сульфаксинаксалин, сульфациридин, сульфаниламид, сульфадиметоксин, сульфаметоксипиридазин), флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), азид натрия, Тритон X-100 (“Sigma-Aldrich”, США), ацетонитрил, метанол, триэтиламин, диэтиленгликоль, хлороформ (“Merck”, Германия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи и органические растворители) были аналитической или химической чистоты. Овечья антисыворотка к сульфатазиолу была предоставлена профессором Р. Джакманом (Центральная ветеринарная лаборатория Эдлестона, Сюррей, Великобритания).

Для выделения и очистки СТ, меченного ФИТЦ, методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластины “Silufol” (Чехия). Стандартные растворы сульфаниламидов готовили разбавлением исходного раствора концентрацией 1 мг/мл в метаноле до концентраций 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 нг/мл в воде или ацетонитриле. Для пробоподготовки использовали шейкер S-4 с качающейся платформой, (“Elmi”, Латвия). При проведении ПФИА в качестве рабочего буфера использовали 25 мМ боратный буфер (ББ) с 0.1%-ным азидом натрия, pH 8.5. Измерения поляризации флуоресценции проводили с помощью анализатора TDx (“Abbott”, США) и поляризационного флуориметра “Beacon 2000” (“Panvera”, США).

Синтез конъюгата СТ с ФИТЦ (трейсера). К раствору 2.5 мг СТ в 1 мл метанола (10 мкмоль/мл), содержащему 50 мкл триэтиламина, добавляли 4 мг (10 мкмоль) ФИТЦ. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре. СТ—ФИТЦ выделяли методом ТСХ в смеси хлороформ—метанол, 4 : 1. С пластин собирали основную полосу ($R_f = 0.1$). Экстракцию продукта

реакции проводили 1 мл метанола [24]. Раствор трейсера хранили при 4°C.

Тестирование антисыворотки методом ПФИА. Антисыворотку, специфичную к СТ, разводили в ББ в пределах 1 : 200–1 : 10⁶ и добавляли раствор трейсера. Рабочую концентрацию трейсера определяли как разведение, при котором интенсивность флуоресценции составляла ~1000 относительных единиц (ОЕ). Титр антисыворотки определяли как разведение, соответствующее 50% связыванию с трейсером. Для проведения ПФИА использовали разведение антисыворотки, соответствующее 70–80% связыванию с трейсером.

ПФИА СТ. Для проведения анализа в кюветы вносили по 25 мкл растворов СТ (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 нг/мл) и по 250 мкл трейсера (0.6 нМ) и антисыворотки в разведении 1 : 870, затем измеряли поляризацию флуоресценции, регистрируя величину mP. Длина волны возбуждающего света – 485 нм, регистрируемого излучения – 525 нм.

Математическая обработка результатов ПФИА. Зависимость поляризации флуоресценции (y) от концентрации аналита в пробе (x) аппроксимировали при помощи программного продукта Origin 7.5 (“Origin Lab”, США), используя четырехпараметрическую сигмоидную функцию:

$$y = (A - B) / (1 + (x/C)^D) + B,$$

где A и B – асимптотические максимум и минимум сигнала, C – точка перегиба кривой в полупологарифмических координатах (50%-ное снижение сигнала, IC_{50}), D – наклон кривой в точке перегиба.

Концентрации СТ, вызывающие снижение сигнала на 20% и 80%, рассматривали в качестве нижнего и верхнего пределов диапазона определяемых концентраций. Концентрацию СТ, вызывающую 10%-ное снижение сигнала, рассматривали как предел обнаружения (ПрО) [25].

Оценка специфичности ПФИА. Для оценки специфичности анализа определяли коэффициенты перекрестной реактивности (ПР) структурных аналогов СТ. Для этого реализовали ПФИА как описано выше, добавляя вместо СТ растворы других сульфаниламидов. Величины ПР рассчитывали по формуле:

$$ПР = IC_{50СТ} / IC_{50СА} \times 100\%,$$

где $IC_{50СТ}$ – концентрация СТ, $IC_{50СА}$ – концентрация перекрестно-реагирующего сульфаниламида.

Изучение кинетики образования иммунных комплексов. Для изучения кинетики ассоциации трейсера с антителами, специфичными к СТ, в кювету вносили в рабочих концентрациях трейсер (250 мкл), сыворотку (250 мкл) и измеряли поляри-

зацию флуоресценции с интервалом 7 с. После достижения равновесия добавляли стандартный раствор СТ (25 мкл) и регистрировали кинетику диссоциации комплекса антитело–трейсер.

Пробоподготовка меда. Методика 1. Мед разбавляли до концентрации 50 мг/мл фосфатно-солевым буфером с тритоном (ФСБТ; 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, с 0.1 М NaCl, 0.05% детергента Тритон X-100), полученный раствор перемешивали на шейкере в течение 10 мин.

Методика 2. К 1 г меда добавляли 4 мл смеси этилацетат–вода, 1 : 1, и перемешивали на шейкере в течение 10 мин. Затем смесь центрифугировали при 3000 g и температуре 4°C в течение 10 мин. Органический слой отбирали и упаривали при 60°C.

Методика 3. К 2.5 г меда добавляли 2.5 мл 2 М соляной кислоты и перемешивали на шейкере в течение 15 мин, затем 10 М гидроксидом натрия доводили pH раствора до 4.5 и добавляли 5 мл ацетонитрила, 1.25 мл дихлорметана и 0.25 г хлорида натрия. Полученную смесь перемешивали на шейкере в течение 10 мин, центрифугировали при 15000 g и температуре 4°C в течение 10 мин и отбирали органический слой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика специфических иммунореагентов. Эффективность ПФИА напрямую связана со свойствами меченого аналита (трейсера). В данной работе в качестве трейсера был синтезирован конъюгат сульфатаиозола с флуоресцентной меткой флуоресцеинизотиоцианатом (рис. 1б). ФИТЦ является традиционным маркером в ПФИА, частый выбор которого обусловлен доступностью и легкостью присоединения к антигенам [18]. Перед реализацией ПФИА было изучено взаимодействие трейсера с антителами, специфичными к СТ; на основании полученных результатов выбирали его рабочую концентрацию. Оптимальной являлась концентрация трейсера, при которой интенсивность его флуоресценции в 10 раз больше фоновой флуоресценции в ББ, то есть составляла ~1000 ОЕ. Это требование достигалось при концентрации трейсера 0.6 нМ.

Использованная в работе овечья антисыворотка была получена против конъюгата СТ с овальбумином. Для определения титра антисыворотки к серии ее разведений добавляли раствор трейсера и регистрировали поляризацию флуоресценции. На рис. 2 представлена кривая титрования антисыворотки, подтверждающая взаимодействие трейсера с антителами. За величину титра антисыворотки принимали разведение 1 : 1500, которое обеспечивало 50% связывания с меченым антигеном. Максимальная чувствительность ПФИА достигалась

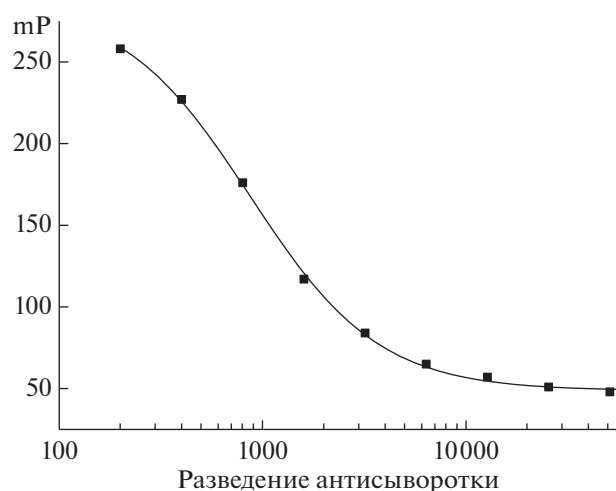


Рис. 2. Кривая титрования антисыворотки.

при 50%-ном связывании трейсера, но при этом уменьшался диапазон определяемых концентраций; поэтому использовали разведение антисыворотки 1 : 870, обеспечивающее 70–80%-ное связывание с трейсером.

ПФИА сульфатазозола. Используя выбранные на предыдущем этапе концентрации иммунореагентов, получили градуировочную кривую, представленную на рис. 3. Согласно результатам аппроксимации этой кривой, ПрО СТ составлял 3 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций — 9–350 нг/мл, $IC_{50} = 59$ нг/мл.

Оценка специфичности ПФИА. Специфичность анализа оценивали, детектируя структурные аналоги СТ. Для этого в качестве тестируемой пробы вместо СТ брали другой сульфаниламидный препарат и регистрировали поляризацию флуоресценции. Установленные коэффициенты перекрестной реактивности представлены в табл. 1. Хотя все изу-

Таблица 1. Коэффициенты перекрестной реактивности (ПР) ПФИА сульфатазозола и его структурных аналогов

Название соединения	Коэффициент ПР, %
Сульфатазозол	100
Сульфаметазин	0.5
Сульфадиазин	0.2
Сульфамеразин	<0.1
Сульфаметоксазол	1.6
Сульфахиноксалин	<0.1
Сульфадиметоксин	<0.1
Сульфapiридин	2.9
Сульфаниламид	<0.1
Сульфахлорпиридазин	0.7
Сульфаметоксипиридазин	<0.1

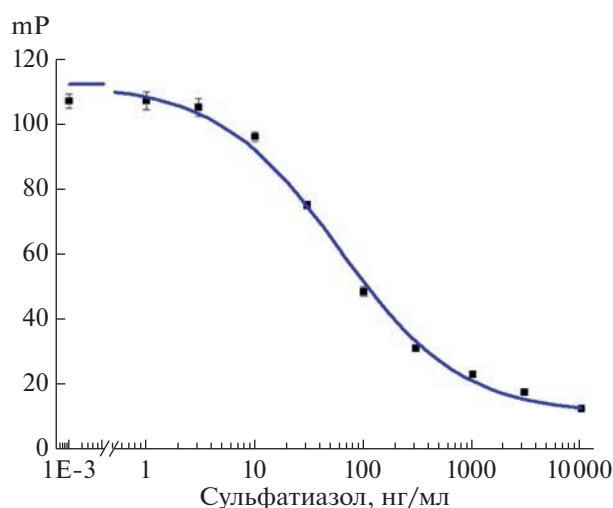


Рис. 3. Калибровочная кривая сульфатазозола в ПФИА.

ченные сульфаниламиды являются структурными аналогами СТ, отличаясь только радикалом при N4-атоме, коэффициенты перекрестного реагирования для них не превосходили 3%. Таким образом, разработанный ПФИА характеризовался высокой специфичностью, что позволило применять его для обнаружения СТ в присутствии близких по структуре соединений.

Изучение кинетики комплексообразования антиген–антитело. При исследовании формирования и диссоциации иммунных комплексов измерения поляризации флуоресценции проводили через промежутки времени, равные 7 с. Этот интервал был минимально достаточным для измерения вертикальной и горизонтальной составляющей излучаемого света для используемых анализаторов. Зависимость поляризации флуоресценции от времени при взаимодействии антител с флуоресцентно меченым антигеном приведена на рис. 4. Как видно из графика, равновесие в системе наступает через 1.5–2 мин, то есть анализ может быть реализован за очень короткое время. Экспрессность — одно из главных преимуществ ПФИА по сравнению с таким широко распространенным методом, как твердофазный иммуноферментный анализ.

Определение сульфатазозола в меде. Мед — один из наиболее сложных для тестирования пищевых матриц, представляющий собой смесь углеводов, белков, органических кислот и других биологически активных соединений [26]; поэтому при тестировании проб меда обязательна пробоподготовка, обеспечивающая эффективную экстракцию СТ и снижение влияния матрикса на получаемые результаты. Известно, что сульфаниламиды образуют ковалентные связи с глюкозой, фруктозой и другими углеводами, что усложняет пробоподго-

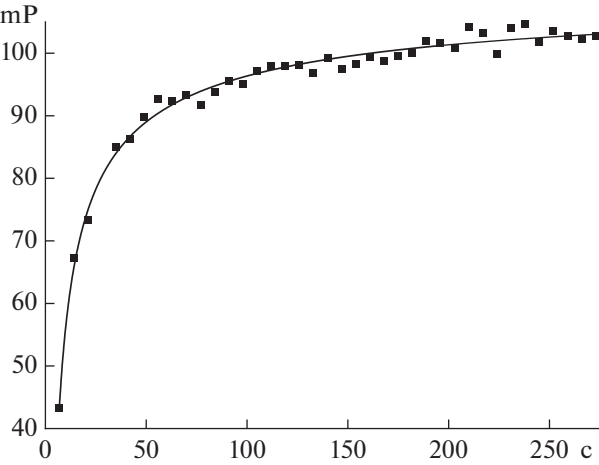


Рис. 4. Кинетическая кривая взаимодействия антител с флуоресцентно меченым антигеном.

товку [27]. Следует также учитывать, что на величину поляризации флуоресценции значительное влияние оказывает вязкость среды, которая возрастает с ростом концентраций углеводов и белков, содержащихся в меде. При этом для экспрессного тестирования нужна простая в реализации методика пробоподготовки с минимальным количеством стадий.

Учитывая все вышесказанное, были сопоставлены три методики. Первая заключалась в простом

Таблица 2. Коэффициенты извлечения СТ из меда, определенные в ПФИА

Добавленный СТ, нг/г	Определенный СТ, нг/г	Коэффициент извлечения, %
25	19 ± 3	76 ± 8
50	41 ± 2	83 ± 5
70	59 ± 6	84 ± 8
210	164 ± 10	78 ± 5

разведении меда в ФСБТ. Во второй методике СТ экстрагировали смесью воды и этилацетата с последующим центрифугированием, упариванием экстрактов и их перерастворением в ФСБТ. В третьей методике проводили гидролиз ковалентных связей между углеводами и сульфаниламидами, а также осаждение органическими растворителями содержащихся в меде белков. Сравнение полученных концентрационных зависимостей ПФИА показало, что наиболее эффективна третья методика пробоподготовки, позволяющая минимизировать матричные эффекты меда. Эта методика является простой и быстрой, ее продолжительность – 35 мин. Она и была выбрана для дальнейших экспериментов.

Проанализировали 17 проб разных видов меда из различных регионов России. Для определения коэффициентов извлечения СТ в пробы цветочного меда из Брянской области, не содержащего

Таблица 3. Определение СТ в пробах меда методом ПФИА

№ пробы	Регион России	Содержание СТ, нг/г (n = 3)
1	Волгоградская область	33 ± 3
2	Башкирия	48 ± 5
3	Волгоград	<16
4	Новосибирск	24 ± 1
5	Адыгея	30 ± 3
6	Тамбовская область	<16
7	Саратовская область	<16
8	Брянск	18 ± 1
9	Брянская область	<16
10	Воронеж	<16
11	Вятка	<16
12	Ставрополье	<16
13	Не указан	<16
14	Не указан	32 ± 1
15	Не указан	24 ± 1
16	Не указан	<16
17	Не указан	<16

сульфаниламиды, вносили известные количества СТ, а после пробоподготовки проводили ПФИА. Из представленных в табл. 2 данных видно, что разработанная методика выявляет 76–84% СТ в меде. Некоторое снижение выявленной концентрации СТ относительно добавленной может быть связано с неполной экстракцией аналита, а также с частичной экстракцией сахаров, которые мешают определению [27]. Полученные данные позволили реализовать ПФИА СТ в пробах с неустановленным содержанием сульфаниламидов. Результаты приведены в табл. 3. Из таблицы видно, что все пробы содержали СТ, однако его содержание ниже МДУ.

Таким образом, впервые разработан поляризационный флуоресцентный иммуноанализ антибактериального препарата сульфатиазола как одного из контаминантов меда и другой пчеловодческой продукции. Анализ характеризовался пределом обнаружения 3 нг/мл, что существенно ниже нормативных требований для сульфаниламидов. Высокая специфичность аналитической системы позволит использовать ее для селективного выявления сульфатиазола. Показана применимость разработанного подхода для выявления сульфатиазола в пробах меда.

Авторы выражают благодарность профессору Р. Джакману (Центральная ветеринарная лаборатория Эдлестона, Сюррей, Великобритания) за предоставление антисыворотки к сульфатиазолу.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-76-10033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pasupuleti V.R., Sammugam L., Ramesh N., Gan S.H. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017. V. 1. P. 259–510.
2. Samarghandian S., Farkhondeh T., Samini F. // *Pharmacognosy Res.* 2017. V. 9. № 2. P. 121–127.
3. Reybroeck W., Daeseleire E., De Brabander H.F., Herman L. // *Vet. Microbiol.* 2012. V. 158. № 1–2. P. 1–11.
4. Bacanlı M., Başaran N. // *Food Chem. Toxicol.* 2019. V. 125. P. 462–466.
5. Arsène M.M.J., Kitio A., Podoprigrora I.V., Smolyakova L.A., Sarra S., Khelifi I., Das M.S. // *Vet. World.* 2022. V. 15. № 3. P. 662–671.
6. Martinello M., Baggio A., Gallina A., Mutinelli F. // *J. Agric. Food Chem.* 2013. V. 61. № 38. P. 9275–9279.
7. ТР ТС 021/2011. Технический регламент Таможенного Союза о безопасности пищевой продукции. М.: Изд-во стандартов, 2011. 27 с.
8. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. // *Official J. European Communities.* 2010. N L15. P. 1–72.
9. Moretti S., Saluti G., Galarini R. // In: *Honey Analysis.* / Eds. Vagner De Alencar, Arnaut De Toledo. Chapter 15. London: Intechopen, 2017. P. 325–365.
10. de Campos V.M., Andrade M.A., Maciel E.V.S., de Toffoli A.L., Lanças F.M. // *Food Addit. Contam. Part A.* 2022. V. 39. № 5. P. 925–937.
11. Dubreil-Chéneau E., Pirotais Y., Verdon E., Hurtaud-Pessel D. // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1339. P. 128–136.
12. Hassani N.E.A.E., Baraket A., Neto E.T.T., Lee M., Salvador J.P., Marco M.P. et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2017. V. 93. P. 282–288.
13. Li X., Yang Y., Miao J., Yin Z., Zhai Y., Shi H., Li Z. // *Rev. Argent. Microbiol.* 2019. V. 51. № 4. P. 345–353.
14. Tumini M., Nagel O.G., Althaus R.L. // *Electrophoresis.* 2020. V. 41. № 18–19. P. 1584–1591.
15. Ouyang S., Yu S., Le Y. // *Foods.* 2022. V. 11. № 6. Article 803. <https://doi.org/10.3390/foods11060803>
16. Adunphatcharaphon S., Elliott C.T., Sooksimuang T., Charlermroj R., Petchkongkaew A., Karoonuthaisiri N.J. // *J. Hazard. Mater.* 2022. V. 432. Article 128706. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128706>
17. Rodriguez R.S., O'Keefe T.L., Froehlich C., Lewis R.E., Sheldon T.R., Haynes C.L. // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. № 1. P. 23–40.
18. Hendrickson O.D., Taranova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A. *Sensors.* 2020. V. 20. № 24. Article 7132. <https://doi.org/10.3390/s20247132>
19. Xiao X., Zhen S. // *RSC Adv.* 2022. V. 12. № 11. P. 6364–6376.
20. Wang Z., Zhang S., Nesterenko I.S., Eremin S.A., Shen J. // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 17. P. 6871–6878.
21. Zhang S., Wang Z., Nesterenko I.S., Eremin S.A., Shen J. // *Int. J. Food Sci. Tech.* 2007. V. 42. № 1. P. 36–44.
22. Murtazina N.R., Eremin S.A., Mozoleva O.V., Everest S.J., Brown J.A., Jackman R. // *Int. J. Food Sci. Tech.* 2004. V. 39. № 8. P. 879–889.
23. Wang Z., Zhang S., Ding S., Eremin S.A., Shen J. // *Food Addit. Contam. Part A.* 2008. V. 25. № 5. P. 574–582.
24. Eremin S.A., Smith D.S., Landon J., Jackman R. // *Analyst.* 1994. V. 119. № 12. P. 2723–2726.
25. Uhrovčík J. // *Talanta.* 2014. V. 119. P. 178–180.
26. Mateo R., Bosch-Reig F. // *Food Chem.* 1997. V. 60. № 1. P. 33–41.
27. Schwaiger I., Schuch R. // *Deutsche Lebensmittel-Rundschau.* 2000. V. 96. № 3. P. 93–98.

Development of Fluorescence Polarization Immunoassay of Sulfathiazol and its Application for Honey Testing

I. S. Nesterenko^a, O. D. Hendrickson^b, N. I. Smirnova^b, S. A. Eremin^c, and D. V. Sotnikov^{b, *}

^a *The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, 123022 Russia*

^b *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^c *Lomonosov Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru*

A fluorescence polarization immunoassay has been developed for the detection of the antibacterial sulfathiazole. The latter belongs to the sulfonamide class of antibacterial, which is used in beekeeping for the prevention and treatment of infectious diseases of bees. The assay conditions, which ensure the achievement of high analytical characteristics, are determined. The duration of the analysis is 5 min; the limit of sulfathiazole detection is 3 ng/mL. A study of the assay selectivity concerning other sulfonamides demonstrated the high specificity only towards sulfathiazole. The optimal method of sample preparation before the control honey contamination was proposed. The effectiveness of the developed analysis for the detection of sulfathiazole in honey samples was confirmed. The developed fluorescent polarization immunoassay is a rapid and efficient analytical system for rapid and sensitive control of honey quality and safety.

Keywords: sulfathiazole, antibiotics, fluorescence polarization immunoassay, food quality control, honey

ВЛАДИМИР ПЕТРОВИЧ ВЕЙКО (14.12.1952–22.10.2022 гг.)

DOI: 10.31857/S0555109923010130, EDN: CIXXRT



22 октября 2022 года на 70-м году ушел из жизни наш коллега, товарищ и наставник, специалист в области молекулярной биологии и биотехнологии, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии и руководитель группы “Белковой инженерии” ФИЦ Биотехнологии РАН — Владимир Петрович Вейко.

После окончания химического факультета МГУ кафедры “Химии природных соединений” в 1976 г. поступил в аспирантуру на факультете и впоследствии в 1980 г. успешно защитил кандидатскую диссертацию по теме “Разработка рациональной схемы синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на полимерном носителе” по специальности биоорганическая химия.

В июне 1984 г. перешел на работу в ГосНИИ-Генетика, сначала старшим научным сотрудником, потом возглавил лабораторию молекулярной биологии. В 1995 г. защитил докторскую диссертацию “Направленная реконструкция ДНК. Исследование структурно-функциональной организации альфа2-интерферона человека и уридинфосфорилазы из *Escherichia coli*” по специальности молекулярная биология. В 2006 г. Владимиру Петровичу было присвоено ученое звание профессора по специальности “Молекулярная биология”.

После перехода на работу в ГосНИИГенетика, благодаря сочетанию таланта организатора и высокому профессионализму сумел наладить синтез олигонуклеотидов в институте, что позволило решать генно-инженерные задачи с большей эффективностью. В результате в лаборатории был налажен полный цикл работ с ДНК от синтеза олигонуклеотидов до секвенирования полученных рекомбинантных фрагментов ДНК, а также осуществлялся полный цикл работ по выделению, очистке и характеристике белков, что позволяло проводить комплексные исследования на самых разных объектах. За годы работы в лаборатории был сконструирован ряд штаммов-продуцентов различных белков, как про- так и эукариот, получены белки, имеющие потенциальное терапевтическое значение.

С 2012 г. со своей научной группой Владимир Петрович переводится в ФИЦ Биотехнологии РАН в лабораторию молекулярной инженерии. Основным интерес последних лет был сфокусирован на изучении двух фундаментальных вопросов функционирования ферментов: молекулярные основы механизма ферментативной реакции пуриннуклеозидфосфорилаз, в частности, уридинфосфорилаз прокариот, а также формированию термостабильности у этого класса ферментов. За период работы в этом направлении Владимиром

Петровицем было налажено эффективное межлабораторное и межинститутское взаимодействие, позволяющее проводить комплексные исследования от создания мутантной или гибридной формы белка до получения кристалла и проведения РСА. В результате такого сотрудничества были опубликованы серии статей, а полученные результаты позволили выявить роль отдельных аминокислотных остатков в функционировании данного типа белков.

Владимир Петрович автор более 130 статей, 7 патентов, под его руководством подготовлено к защите 8 кандидатских диссертаций. Активно участвовал в работе экзаменационных комиссий

биологического факультета МГУ на защитах бакалаврских и магистерских дипломов.

Соавтор книги “Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел”. В.П. Вейко читал лекции и участвовал в методической подготовке экспертов в области проведения молекулярно-биологической идентификации методом ПЦР для лабораторий.

Уход Владимира Петровича невосполнимая утрата для его коллег и близких. Мы выражаем искренние соболезнования его супруге и близким.

ФИЦ Биотехнологии РАН
Редколлегия журнала