

Федеральное агентство по образованию
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
Высшего профессионального образования
Пушкинский государственный естественно-научный институт

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН

На правах рукописи

АГАФОНОВА НАДЕЖДА ВАЛЕРИЕВНА

**Таксономическая и функциональная характеристика аэробных
метилотрофных бактерий-фитосимбионтов**

(03.02.03 – Микробиология)

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель
д.б.н., в.н.с., проф. Н. В. Доронина

Пушино 2017

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ	8
1.1. Пути окисления и ассимиляции C ₁ -соединений	9
1.1.2. Окисление метанола	9
1.1.3. Окисление метиламина	11
1.1.4. Окисление формальдегида	12
1.1.5. Диссимиляционный рибулозомонофосфатный путь	13
1.1.6. Окисление формиата	14
1.1.7. Пути ассимиляции C ₁ -соединений	14
1.2. Центральный метаболизм	21
1.3. Идентификация аэробных метилотрофных бактерий	21
2. АССОЦИАЦИИ АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ С РАСТЕНИЯМИ	29
2.1. Разнообразие аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями	29
2.2. Влияние аэробных метилотрофных бактерий на рост и развитие растений	32
3. МЕХАНИЗМЫ ФИТОСИМБИОЗА	34
3.1. Синтез фитогормонов	34
3.1.1. Ауксины	35
3.1.2. Гиббереллины	38
3.1.3. Цитокинины	42
3.2. Витамин B ₁₂	43
3.3. Фиксация атмосферного азота	44
3.4. Влияние метиловых бактерий на содержание этилена в растениях	45
3.5. Сидерофоры	45
3.6. Растворение минеральных фосфатов	49
3.7. Антиоксидантная защита растений	50
4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
4.1. Бактериальные штаммы и условия культивирования	53
4.1.1. Бактериальные штаммы	53
4.1.2. Условия культивирования	54
4.2. Методы исследования	56
4.2.1. Микроскопия	56
4.2.2. Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств	56
4.2.3. Аналитические методы	58
4.2.3.1. Выделение и анализ изопреноидных хинонов	58

4.2.3.2. <i>Определение состава жирных кислот</i>	59
4.2.3.3. <i>Определение состава фосфолипидов</i>	59
4.2.3.4. <i>Количественный анализ индольных соединений</i>	60
4.2.3.5. <i>Идентификация гиббереллинов</i>	61
4.2.3.6. <i>Анализ фосфатсолюбилизирующей способности</i>	62
4.2.3.7. <i>Анализ способности к синтезу сидерофоров</i>	63
4.2.3.8. <i>Количественное определение белка</i>	64
4.2.3.9. <i>Спектрофотометрические измерения</i>	65
4.2.3.10. <i>Протеомный МАЛДИ-анализ</i>	65
4.2.4. Биохимические методы	66
4.2.4.1. <i>Определение активностей ферментов</i>	66
4.2.4.2. <i>Биохимические тесты</i>	69
4.2.5. Радиометрические измерения	69
4.2.6. Молекулярно-генетические методы	69
4.3.6.1. <i>Выделение и анализ ДНК.</i>	69
4.2.6.2. <i>RAPD-анализ (метод случайной амплификации полиморфной бактериальной ДНК)</i>	70
4.2.6.3. <i>Филогенетический анализ</i>	70
4.3. Культивирование растений и анализ растительного материала	71
4.3.1. Растительный материал, среды для культивирования растений	71
4.3.2. Культивирование растений в стерильных условиях <i>in vitro</i>	72
4.3.3. Культивирование растений в нестерильных условиях (микровегетационный опыт)	72
4.3.4. Анализ растительного материала	72
5. РЕЗУЛЬТАТЫ	76
5.1. Разнообразие культивируемых мегилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями Южного Подмосковья	76
5.2. Характеристика новых изолятов аэробных мегилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями	80
5.2.1. Морфология	80
5.2.2. Культуральные, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства	80
5.2.3. Энзимологический анализ	83
5.2.4. Филогенетический анализ	85
5.3. Синтез фитогормонов аэробными мегилотрофными бактериями, ассоциированными с растениями	103
5.3.1. Синтез ауксинов	103
5.3.2. Синтез гиббереллинов	103

5.4. Фосфатсольбилизирующая активность	106
5.5. Синтез сидерофоров	109
5.6. Антагонистическая активность	111
5.7. Исследование устойчивости растений гороха к окислительному стрессу, вызванному паракватом, при колонизации аэробными метилотрофными бактериями	112
5.8. Влияние метиловых бактерий на рост растений	118
5.8.1. Влияние метиловых бактерий на рост и морфогенез растений, культивируемых <i>in vitro</i>	118
5.8.2. Влияние метиловых бактерий на рост и морфогенез растений, культивируемых в микровегетационных условиях	119
Диагнозы новых таксонов	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

Введение

Актуальность проблемы. Аэробные метилотрофные бактерии – метиловобактерии – составляют особую физиологическую группу микроорганизмов, обладающих уникальной способностью использовать окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. Эта таксономически и физиологически гетерогенная группа включает представителей более 50 родов, относящихся к классам *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria, *Verrucomicrobia*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteriia* (Kolb, 2009; Троценко с соавт., 2010; Доронина с соавт., 2015).

Метанол и другие C₁-соединения являются естественными продуктами метаболизма растений. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что метиловобактерии являются фитосимбионтами. Метилотрофы постоянно ассоциированы с растениями, потребляют C₁-соединения в качестве источников углерода и энергии и реализуют различные механизмы влияния на рост растений (Троценко с соавт., 2010; Доронина с соавт., 2015). Известно, что метиловобактерии стимулируют рост растений, путем синтеза растительных гормонов, таких как ауксины, цитокинины, образуя дезаминазу 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, снижающую содержание этилена – гормона старения растений, а также синтезируют витамин B₁₂, фиксируют атмосферный азот, улучшая тем самым питание растений (Федоров с соавт., 2011).

Актуальным является выделение новых культивируемых штаммов метиловобактерий-фитосимбионтов, изучение стратегий и тактик их взаимодействия с растениями. Расширение коллекции чистых культур метилотрофных фитосимбионтов, детальная характеристика и сравнительное исследование физиолого-биохимических аспектов фитосимбиоза разных штаммов метиловобактерий позволят оценить их метаболический потенциал для применения в новых биотехнологиях культивирования растений и провести селекцию наиболее перспективных штаммов-стимуляторов роста и развития растений.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – расширение спектра культивируемых метиловобактерий-фитосимбионтов и исследование реализуемых метиловобактериями механизмов положительного влияния на растения.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить чистые культуры метиловобактерий из филлосферы и ризосферы различных растений, установить их филогенетическое положение, методами полифазной таксономии идентифицировать претендентов на новые виды и провести энзимологический анализ путей их C₁-метаболизма;

2. Выявить и доказать способность некоторых представителей метиловых бактерий синтезировать фитогормоны – гиббереллины;
3. Провести анализ фосфатсольбилизирующей, антагонистической активностей и способности к синтезу сидерофоров у представителей различных родов метиловых бактерий;
4. Изучить влияние колонизации растений метиловыми бактериями на устойчивость к стрессовым воздействиям, индуцированным гербицидом паракватом;
5. Оценить влияние исследуемых штаммов метиловых бактерий на рост и морфогенез растений.

Научная новизна работы. Получены новые данные о культивируемых аэробных метиловых бактериях, ассоциированных с растениями. С использованием подходов полифазной таксономии описаны три новых вида: *Methylopila turkensis*, *Ancylobacter sonchi* и '*Methylobacillus caricis*'. Впервые описан метилотрофный представитель рода *Delftia*, способный расти на метаноле – естественном продукте метаболизма растений – штамм *Delftia* sp. Lp-1, обладающий антагонистической активностью против бактерий *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170 и *B. cereus* ATCC 14579^T и фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *Fusarium sporotrichum*.

Впервые показана фосфатсольбилизирующая активность у 14 штаммов аэробных метиловых бактерий, ассоциированных с растениями и принадлежащих к родам *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, *Methylopila*, *Methylobacterium*, *Delftia* и *Ancylobacter*.

Выявлена способность к хелатированию ионов железа при помощи сидерофоров у представителей родов *Methylovorus*, *Methylophilus*, *Methylopila* и *Ancylobacter*.

Впервые доказана способность облигатного метилотрофа *Methylobacillus arboreus* Iva^T синтезировать биоактивную гибберелловую кислоту GA₃.

Показано, что колонизация метиловыми бактериями существенно повышает индуцированную системную устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, вызванному гербицидом паракватом.

Научно-практическое значение работы. Коллекции метилотрофных микроорганизмов пополнены тремя новыми видами охарактеризованных культур: *Methylopila turkensis* sp. nov. (VKM B-2748^T = DSM 27566^T), *Ancylobacter sonchi* sp. nov. (VKM B-3145^T = JCM 32039^T), '*Methylobacillus caricis*' sp. nov. (VKM B-3158 = JCM 32031), и доступны научной общественности для последующих исследований, как в фундаментальном, так и в прикладном аспектах.

Выявлены новые механизмы положительного влияния метиловых бактерий-фитосимбионтов на рост растений – фосфатсольбилизирующая активность, синтез фитогормонов-гиббереллинов, повышение устойчивости к стрессовым факторам.

Полученные данные расширяют представление о биоразнообразии аэробных метиловых бактерий, ассоциированных с растениями, а также раскрывают перспективы их применения в качестве объектов агrobiотехнологии.

Создана база данных белковых профилей типовых представителей рода *Methylopila* на основании MALDI-TOF/MS анализа, показано высокое разрешение этого метода для разделения представителей рода *Methylopila* на видовом уровне.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на 16–20-й международных школах-конференциях «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2012–2016 гг.); на VIII Молодёжной конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, ИНМИ РАН, 2012 г.); международной конференции «Биология – наука XXI века» (Москва, Российский экономический университет им. Г.В.Плеханова, 2012); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012 г.); VI Международной конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция» (Одесса, 2013 г.), на конференциях «Экотоксикология» (Тула, 2013, 2015 гг.); ежегодных конференциях ИБФМ РАН (Пущино, 2012–2016 гг.); Международной научно-практической конференции «Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству» в рамках III Международных Фарабиевских чтений (Алматы, 2016 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 23 работы, из них 8 статей – в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы данных.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, диагнозов новых таксонов, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Текст работы занимает 156 страниц, содержит 42 рисунка и 12 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 332 ссылки.

Благодарности. Автор искренне признателен д.б.н. (ИБФМ РАН), проф. (ПущГЕНИ) Дорониной Н.В. и зав. лабораторией радиоактивных изотопов, д.б.н., проф. Троценко Ю.А. за ценное руководство в проведении работы, за постоянное внимание и поддержку на всех этапах работы. Выражается благодарность к.б.н. Сузиной Н.Е. за проведение микроскопических исследований, к.б.н. Лауринавичюсу К.С. за проведение МАЛДИ анализа, к.б.н. Капаруллиной Е.Н., к.б.н. Торгонской М.Л., к.т.н. Ежову В.А., к.б.н. Анохиной Т.О., к.б.н. Детковой Е.Н. (ИНМИ РАН), к.б.н. Быстровой О.В. (Международный аналитический центр ИОХ РАН) и другим коллегам за всестороннюю помощь при выполнении диссертационной работы.

Работа поддержана грантами: РФФИ №№ 12-04-31373-мол_а, 14-04-313552-мол_а, 13-04-01520-а, 15-04-04458-а, 16-04-00381-а, РФФИ №14-14-01045, ГЗ №6.749.2014/к.

1. Особенности биологии аэробных метилотрофных бактерий

Аэробные метилотрофные бактерии составляют особую физиологическую группу микроорганизмов, обладающих уникальной способностью использовать метан (метанотрофы) и его окисленные и замещенные производные (метилобактерии) в качестве источников углерода и энергии. Метилотрофы широко распространены в природе и участвуют в биосферных циклах превращения углерода, азота, фосфора и других биогенных макро- и микроэлементов, являются важным звеном в цепи метаболических превращений летучих C_1 -соединений и своеобразным биофильтром на их пути в тропосферу, уменьшающим опасность истощения озонового слоя Земли (Доронина с соавт., 2015). Впервые бактерии, способные к аэробному росту на метаноле, как единственном источнике углерода и энергии, были выделены еще в 1892 г. Левом (Loew) (Мюнхенский университет) и названы *Bacillus methylicus*. Открытые в конце XIX века аэробные метилобактерии долгое время оставались энигматическими объектами, о чем свидетельствовали редкие публикации. Лишь во второй половине XX века основополагающие исследования Дж. Р. Квейла, Л. Затмана, К. Энтони, М. Лидстром и К. Маррелла, открывших новые ферменты и гены путей C_1 -метаболизма, придали мощный импульс развитию метилотрофии как научного направления (Троценко с соавт., 2010). Начало систематическому изучению биологии и метаболизма метилотрофов было положено в работах Дж. Р. Квейла, который выделил розовоокрашенную культуру *Pseudomonas* sp. AM1 и расшифровал сериновый путь C_1 -ассимиляции (Peel, Quayle, 1961). К настоящему времени известно более 50 родов метилотрофов, относящихся к классам *Alpha*-, *Beta*- и *Gammaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteriia* (Kolb, 2009; Троценко с соавт., 2010; Доронина с соавт., 2015).

Спектр C_1 -соединений биогенного (и абиогенного) происхождения, используемых метилотрофами в качестве источников углерода и энергии, достаточно широк, что обуславливает трофическую ассоциацию метилотрофов с растениями. Известно, что растения образуют и выделяют в окружающую среду C_1 -соединения, потребляемые метилотрофами (MacDonald et al., 1993; Nemecek-Marshall et al., 1995; Fall, 1996; Keppler et al., 2006). Основными источниками атмосферного метанола являются мертвые растительные остатки и живые растения (76% глобальной ежегодной продукции) ($>10^{11}$ кг С/год) (Galbally, Kirstine, 2002). Метанол высвобождается в результате деметилирования пектина в клеточных стенках под действием пектинметилэстеразы (Frenkel, 1998). Другими источниками метанола из растений являются продукты реакций тетрагидрофолатного пути, функционирования метилтрансферазы белков, деградации лигнина во вторичных клеточных стенках (Hanson, Roje, 2001). Метилированные амины образуются в результате разложения белков и аминокислот,

присутствующих в растительных и животных тканях как продукты обмена. Диметиламин – продукт разложения некоторых пестицидов и окисления триметиламина (Троценко с соавт., 2010). Формальдегид в основном попадает в атмосферу в составе выхлопных газов, образуется в результате фотохимического окисления метана, но в микромолярных концентрациях содержится и в растительных тканях. Формиат является частным продуктом брожения углеводов и органических кислот, его концентрация в растениях составляет 0,1 – 1 мкмоль/г сырой биомассы. Хлорметан в природе образуется морскими водорослями и грибами, выделяется при лесных пожарах и в результате вулканической деятельности (Butler, 2000). Объектами нашего обзора являются аэробные метилотрофные бактерии – метиловобактерии, которые не способны расти на метане. Несмотря на структурную простоту, все C_1 -соединения существенно различаются по физико-химическим свойствам, что определяет особенности биологии и метаболизма метиловобактерий

1.1. Пути окисления и ассимиляции C_1 -соединений

Процессы окисления восстановленных C_1 -субстратов обеспечивают клетки энергией и восстановительными эквивалентами, а также переводят эти субстраты в доступные для ассимиляции формы, т.е. формальдегид, формиат и CO_2 (рис. 1). При этом сначала C_1 -субстраты подвергаются трансформации до формальдегида (ФА) с помощью специализированных ферментов метиловобактерий.

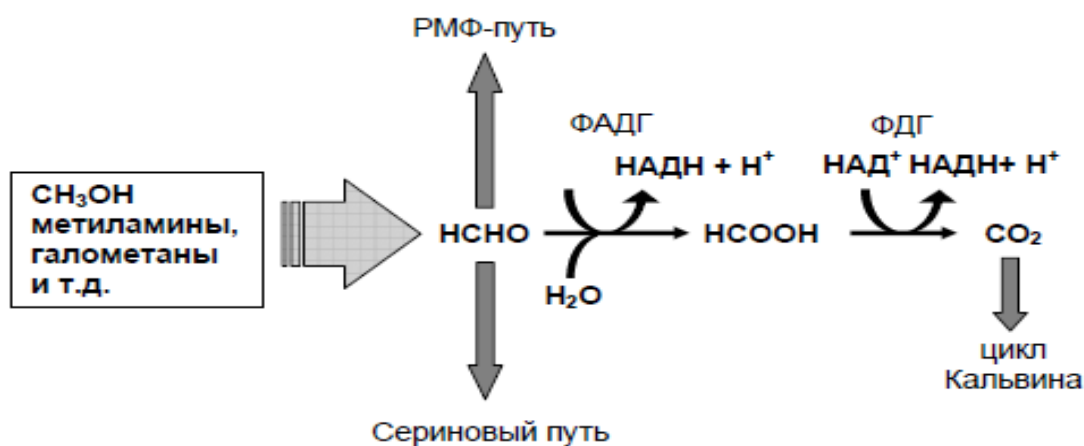


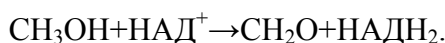
Рис. 1. Центральная роль формальдегида в метаболизме аэробных метилотрофных бактерий (Vorholt, 2002)

1.1.2. Окисление метанола

У метилотрофов ассимиляция метанола начинается с его окисления до формальдегида посредством оксидоредуктаз. Метанолдегидрогеназы (МДГ) делятся на 3 группы, основанные на вариантах акцепторов электронов: O₂- (у метилотрофных дрожжей), PQQ- и НАД-зависимые. Большинство граммотрицательных метиловобактерий окисляют метанол классической

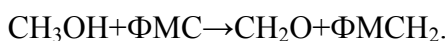
PQQ-зависимой МДГ (Anthony, 1982), которая захватывает электроны и передает их на цитохром *c* (Krog et al., 2013).

НАД-зависимая форма МДГ, в отличие от PQQ-зависимой, имеет более низкое сродство к метанолу и высшим спиртам; типична для термофильных грамположительных метилотрофов (*Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus methanolicus*), т.к., согласно термодинамическим расчетам, для ассимиляции метанола НАД-зависимой МДГ более благоприятны высокие температуры (оптимально 45-55°C) (Whitaker et al., 2015):



Метанолдегидрогеназа *B. methanolicus* MGA3, состоит из трех генов (*mdh*, *mdh2*, *mdh3*) и белка-активатора, ответственного за повышение сродства к метанолу, скорость окисления и активность НАД-зависимой МДГ. Кроме того, она может функционировать в аэробных и анаэробных условиях, в то время как PQQ-зависимая МДГ ограничена аэробными условиями (Zhang et al., 2017).

МДГ мезофильных грамотрицательных метилотрофов (например, *Methylophilus methylotrophus*, *Methylobacterium extorquens*) – $\alpha_2\beta_2$ гетеротетрамер, каждая α -субъединица (66 кДа) содержит молекулу PQQ, ион Ca^{2+} в активном центре и две дисульфидные связи, а β -субъединицы (8,5 кДа) имеют одну S-S связь (Kalyuzhnaya et al., 2008). Этот фермент окисляет первичные спирты и формальдегид, активируется аммонием или метиламином и проявляет активность с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом (ФМС):



Цитохром c_L (19 кДа) является первичным акцептором электронов от МДГ, имеющий типичный гемсвязывающий сайт. От цитохрома c_L электроны передаются на цитохром c_H , который является субстратом для цитохромоксидазы (Anthony, 1986; McDonald, Murrell, 1997). Для образования активной PQQ-зависимой МДГ необходимы: синтез и транспорт PQQ, синтез и транспорт препептидов для α - и β -субъединиц, сборка этих белков в периплазме, изомеризация пролинов, образование дисульфидных связей, введение Ca^{2+} и PQQ, закручивание β -цепей вокруг α -субъединиц и ассоциация $\alpha\beta$ -субъединиц с образованием $\alpha_2\beta_2$ -тетрамера; в этом процессе задействовано около 30 генов (Lidstrom, Stirling, 1990). Большую и малую субъединицы МДГ кодируют гены *mxaF* (1800 п.н) и *mxaI* (290 п.н.), а первичный акцептор переноса электронов цитохром c_L и комплекс вспомогательных белков кодируют гены *mxaG* и *mxaJRSACKLD*, соответственно (McDonald, Murrell, 1997; Chistoserdova et al., 2003), (Whitaker et al., 2015). Ген *mxaF* является высококонсервативным для метилотрофных α -протеобактерий и используется для детекции метилотрофных изолятов в природе (McDonald, Murrell, 1997).

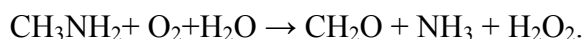
1.1.3. Окисление метиламина

Окисление метиламина осуществляется посредством метиламиндегидрогеназы (МАДГ) (у грамотрицательных бактерий), метиламинооксидазы (МАО) (у грамположительных бактерий) или ферментов N-метилглутаматного пути. МАДГ – является $\alpha_2\beta_2$ гетеротетрамером с триптофантриптофилхиноном в качестве простетической группы. Активность МАДГ отсутствует у клеток, выращенных на среде с метанолом или сукцинатом, но при пересеве бактерий на среду с метиламином активность фермента появляется раньше, чем начинается рост. Периплазматическая МАДГ, катализирует реакцию:



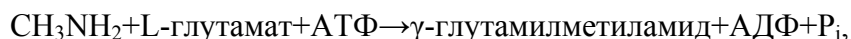
Метиламиндегидрогеназа обнаружена у бактерий родов *Methylobacterium*, *Methylopila*, *Methylohabdus*, *Blastobacter*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Methylobacillus* и *Methylophilus* (Доронина, 1999). У *Methylobacterium extorquens* AM1, *Methylobacillus flagellatus* КТ, *Methylophilus methylotrophus* и *Paracoccus denitrificans* идентифицированы 14 *mau* генов, 8 из которых необходимы для роста на метиламине (Zhang et al., 1993; Van der Palen et al., 1995; Chistoserdova et al., 2003, 2007). От МАДГ электроны передаются на медьсодержащий белок – амицианин – и далее, через цитохромы C_L и C_H , – на цитохромоксидазу.

У различных штаммов *Arthrobacter globiformis* обнаружена МАО, катализирующая окисление метиламина до формальдегида, аммиака и пероксида водорода (Логина, Троценко, 1976):



Фермент содержит два иона Cu^{2+} и одну молекулу ковалентно связанного кофактора пирролхинолинхинона.

Другой первичный механизм метаболизма метиламина реализован у метиловых бактерий родов *Nitrospira*, *Methylobacterium*, *Methylophaga* и *Methylophilus* (Доронина, 1999). Такой механизм получил название N-метилглутаматного пути (N-МГ), где в качестве первичных продуктов фиксации ^{14}C -метиламина образуются γ -глутамилметиламид и N-метилглутамат, реакции катализируются γ -глутамилметиламидсинтетазой и N-метилглутаматсинтазой, соответственно:



Некоторые метилотрофы имеют относительно высокие активности ферментов N-МГ пути в присутствии функциональной МАДГ, у других, не имеющих МАДГ, этот путь является основным для окисления метиламина. И только у галофилов *Methylophilus limanica*, *Methylophilus marina* и *Methylophilus terricola* обнаружена γ -глутамилметиламидлиаза, обеспечивающая образование формальдегида и регенерацию глутамата. Таким образом, N-

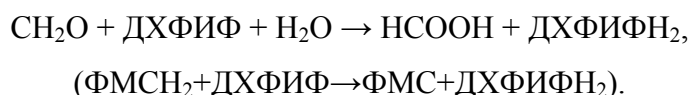
метилпроизводные глутамата играют роль переносчиков метильных групп в основные биосинтетические пути (сериновый или рибулозомонофосфатный) (Троценко с соавт., 2010).

1.1.4. Окисление формальдегида

Центральным продуктом бактериального окисления C_1 -соединений является формальдегид. Окисление метанола до формальдегида (**ФА**) катализируется МДГ, различными у грамотрицательных и грамположительных метилотрофных бактерий. ФА далее может окисляться до CO_2 через формиат циклическим рибулозомонофосфатным (**РМФ**) и линейными путями с участием 4 кофакторов: тетрагидрофолата (**ТГФ**), тетрагидрометаноптерина (**ТГМП**), глутатиона и микотиола (**MySH**) (Vorholt, 2002; Zhang et al., 2017).

Прямое окисление формальдегида до формиата у метилотрофов катализируется тремя ферментами:

1) формальдегид дегидрогеназой (**ФАДГ**), проявляющей активность с дихлорфенолиндофенолом (**ДХФИФ**) и феназинметосульфатом (**ФМС**), искусственными акцепторами электронов, в соответствии с уравнением:



2) $НАД^+$ -зависимой ФАДГ, обнаруженной у большинства метилотрофов и не требующей восстановленного глутатиона (GSH):



3) $НАД^+$ -зависимой ФАДГ, стимулируемой GSH (у грамотрицательных – *Methylobacterium multivorans* и *Paracoccus kondratievae*) и микотиол-зависимой (у грамположительных – *Brevibacterium fuscum* и *Amycolatopsis methanolica*):



Микотиол-зависимый путь обнаружен у метилотрофных бактерий и дрожжей, а также у растений и млекопитающих.

ТГФ-зависимое окисление. Образование комплекса C_1 -единиц, связанных с ТГФ, происходит практически у всех организмов, т.к. C_1 -фрагменты используются в биосинтетических процессах, например, при синтезе пуринов. У большинства организмов в реакциях биосинтеза ТГФ-зависимые ферменты, как правило, экспрессируются на низком уровне, однако метилотрофы, использующие сериновый путь для ассимиляции углерода (например, *Methylobacterium* и *Hyphomicrobium*), имеют высокие уровни активности ТГФ-зависимого фермента, которые индуцируются при росте на метаноле и метиламине. Это объясняется тем, что конденсация метилен-ТГФ и глицина является первой ключевой реакцией серинового цикла. Предполагается, что ТГФ-зависимые ферменты обеспечивают высокий

уровень интермедиатов серинового пути. Обратимость реакций данного пути служит в пользу этого предположения (Троценко с соавт., 2010).

ТГМП-зависимое окисление инициируется конденсацией CH_2O и птеринового кофактора до N5, N10-метиленпроизводного по аналогии с ТГФ-зависимым окислением формальдегида. ТГМП-зависимое окисление ФА является важным катаболическим путем, образующим больше НАДН_2 , чем НАДФН_2 , при этом НАДН_2 используется для аэробного дыхания (Vorholt, 2002). ТГМП-зависимые ферменты имеются у метилотрофных протеобактерий, которые усваивают ФА через сериновый или РМФ-путь (Vorholt et al., 1999).

Активности ферментов ТГМП-пути выше активностей ферментов ТГФ-пути, что предполагает его участие в окислении ФА, тогда как ТГФ-путь выполняет преимущественно процессы метилирования, в том числе метилирование глицина с образованием серина в сериновом пути (Pomper et al., 2002). Кроме того, оба пути участвуют в детоксикации образующегося формальдегида (Vorholt, 2002).

Тиол-зависимое окисление формальдегида, по-видимому, является наиболее распространенной ферментной системой конверсии CH_2O и происходит у метилотрофов посредством GSH- и НАД^+ -зависимой ФАДГ и S-формилглутатионгидролазы (Ras et al., 1995; Goenrich et al., 2002). Этот путь обнаружен у многих других бактерий, а также у млекопитающих, растений и дрожжей, где играет общую роль в детоксикации CH_2O . У грамположительных метилотрофных бактерий в качестве тиолового кофактора может выступать микотиол (MySH) (Spies, Steenkamp, 1994).

1.1.5. Диссимиляционный рибулозомонофосфатный путь

Циклическое окисление ФА в РМФ-пути не связано с участием дегидрогеназ формальдегида и формиата, а представляет собой последовательность реакций пентозофосфатного пути с образованием CO_2 и 2 моль НАДН_2 , а также регенерации интермедиата рибулозо-5-фосфата, первичного акцептора формальдегида (Троценко с соавт., 2010). Ключевой реакцией является альдольная конденсация ФА и рибулозо-5-фосфата с образованием 3-гексулозо-6-фосфата, катализируемая гексулозофосфатсинтазой (**ГФС**). Нестабильный 3-гексулозо-6-фосфат далее при помощи фосфогексуло-изомеразы (**ФГИ**) быстро превращается во фруктозо-6-фосфат (рис. 2) (Kato et al., 2006; Yurimoto et al., 2009).

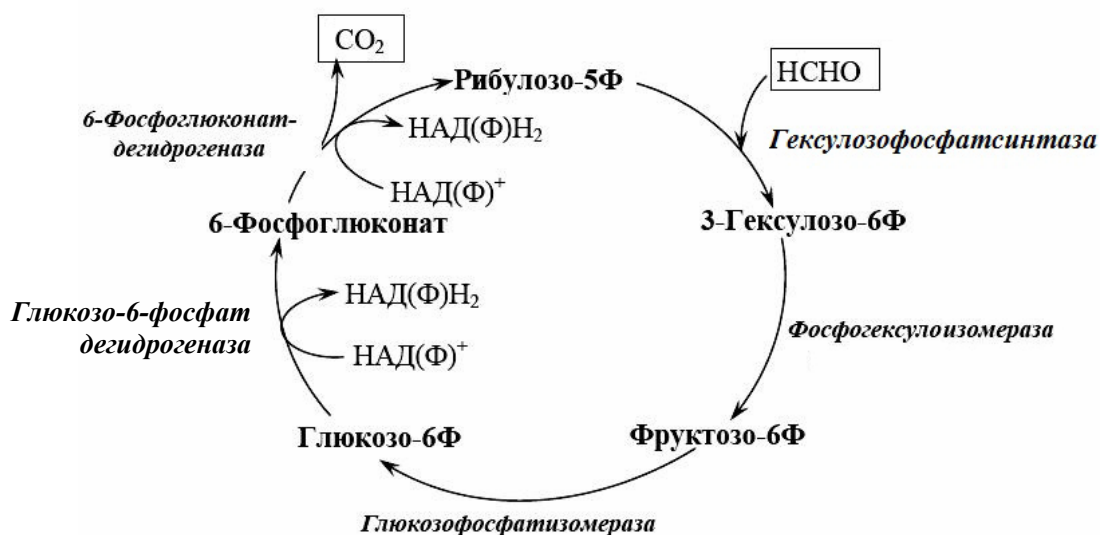
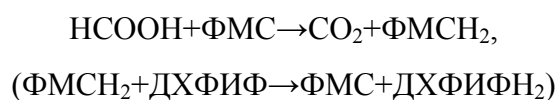


Рис. 2. Диссимиляционный РМФ-цикл окисления формальдегида

1.1.6. Окисление формиата

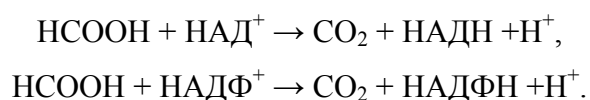
Окисление формиата – завершающая стадия цепи реакций прямого окисления у аэробных метилотрофных бактерий. Ферментами, катализирующими окисление формиата до CO_2 являются:

1) Мембрансвязанная формиатоксидаза, использующая в качестве акцепторов электронов O_2 и ФМС/ДХФИФ (Horner, Trautwein, 1971):



2) Формиатдегидрогеназа (ФДГ), связанная с мембранами и проявляющая активность с ДХФИФ или цитохромом *c* (Deyhle, Barton, 1977).

3) Цитоплазматическая НАД(Ф)⁺-зависимая ФДГ. Активность ФДГ стимулируется добавлением флавинмонокнуклеотида (ФМН) (K_m для ФМН = 0,015-0,03 мкмоль). Окисление формиата происходит согласно уравнению (Egorov et al., 1979):



4) ФДГ, являющаяся высокомолекулярной молибдоптеринзависимым оксидоредуктазоподобным белком (Chistoserdova et al., 2007). Формиатдегидрогеназная реакция служит источником восстановленных пиридиннуклеотидов, необходимых для фиксации CO_2 .

1.1.7. Пути ассимиляции C_1 -соединений

Известны три основных циклических пути, ответственных за биосинтез клеточных компонентов при росте бактерий на C_1 -соединениях, более восстановленных, чем CO_2 :

рибулозомонофосфатный (**РМФ**), рибулозобисфосфатный (**РБФ**) и сериновый. Общим интермедиатом первичного C_1 -окисления является ФА, который непосредственно или после окисления до CO_2 вовлекается в основные биосинтетические пути (рис. 3).

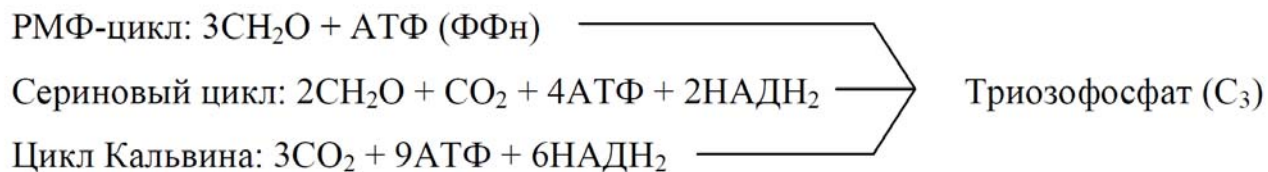


Рис. 3. Энергетические потребности первичных путей C_1 -ассимиляции у метилотрофных бактерий (Троценко с соавт., 2010).

РМФ путь является шунтированным вариантом цикла Кальвина, в котором синтез триозофосфата осуществляется из трех молекул формальдегида. РМФ-цикл можно условно разделить на три стадии:

1) «Фиксация». В первой стадии образуются три молекулы фруктозо-6-фосфата. Этот этап является общим для всех бактерий, реализующих РМФ-цикл ассимиляции ФА:



Реакция катализируется 3-гексулозо-6-фосфатсинтазой (**ГФС**) с образованием 3-гексулозо-6-фосфата, который изомеризуется во фруктозо-6-фосфат 6-фосфо-3-гексулоизомеразой (**ФГИ**) (Kato et al., 2006).

2) «Расщепление». На второй стадии из каждой молекулы фруктозо-6-фосфата образуются две молекулы триоз. На этой стадии возможны два варианта РМФ-цикла:

а. Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата до фруктозо-1,6-бисфосфата (**ФБФ**), далее расщепление на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата (**ГАФ**) в реакции, катализируемой фруктозобисфосфатальдолозой (**ФБФА**-вариант);

б. Окисление фруктозо-6-фосфата через глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконат до 2-кетоглюкозо-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконата (**КДФГ**) ферментами пути Энтнера–Дудорова и далее расщепление КДФГ-альдозой до ГАФ и пирувата (**КДФГ**-вариант).

3) На третьей стадии «перестройка» происходит регенерация трех молекул первичного акцептора, рибулозо-5-фосфата. При этом также возможны два варианта, в которых участвуют транскетолаза (**ТА**-вариант), рибулозо-5-фосфатизомераза и рибулозо-5-фосфатэпимераза. В первом варианте в эту последовательность включается трансальдоза, во втором – седогептулозо-1,7-бисфосфатаза (**СБФ**-вариант). В результате различных комбинаций

упомянутых реакций возможны 4 варианта метаболизма сахаров у метилотрофных бактерий (Троценко с соавт., 2010).

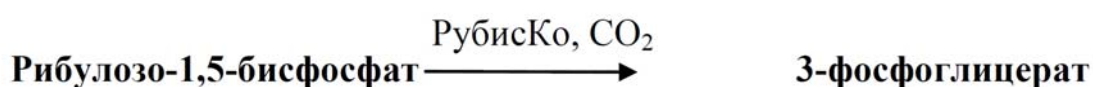
Облигатные метилотрофы кодируют гены ГФС (*hps*) и ФГИ (*phi*), некоторые кодируют по две копии *hps*-гена: один в кластере биосинтеза гистидина, другой рядом с геном *phi*. Факультативные метилотрофы, как правило, используют *phi*-гены как мессенджеры в ответ на повышение концентрации формальдегида (Yurimoto et al., 2009). ФБФА, ФБФА/СБФ-варианты реализуют факультативные метилотрофные бактерии, а КДФГ, КДФГ/ТА-варианты более характерны для облигатных и ограниченно-факультативных метилотрофов родов *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus* и *Methylophaga*. Грамположительные метилотрофы родов *Arthrobacter*, *Mycobacterium* и *Amycolatopsis* реализуют ФБФА/ТА-вариант РМФ-цикла (Троценко с соавт., 2010).

Метилотрофные бактерии с рибулозомонофосфатным путем C_1 -ассимиляции: *Methylobacillus* (Yordy, Weaver, 1977), *Mycobacterium* (Skerman et al., 1980; Lehmann, Neumann, 1896), *Bacillus* (Skerman et al., 1980), *Methylophaga* (Janvier et al., 1985), *Amycolatopsis* (Lechevalier et al., 1986), *Methylophilus* (Jenkins et al., 1987), *Methylovorus* (Govorukhina, Trotsenko, 1991), *Arthrobacter* (Borodina et al., 2002), *Acidomonas* (Yamashita et al., 2004), *Methylostenobacillus* (Kalyuzhnaya et al., 2006, 2012).

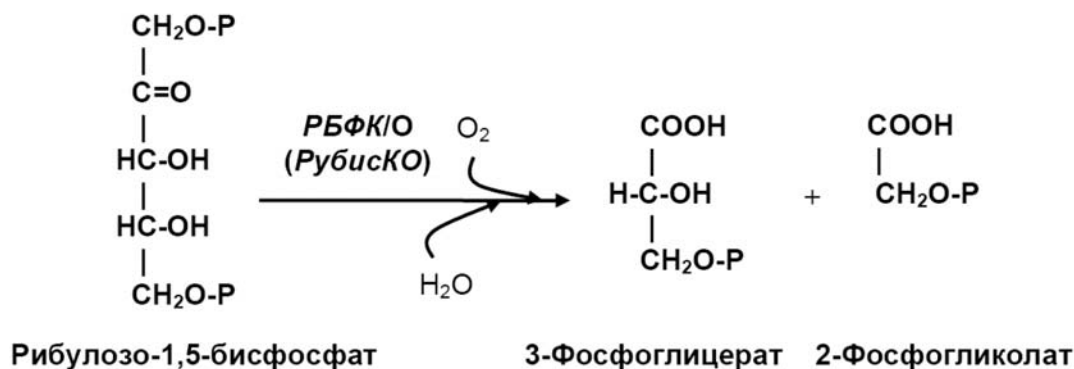
Рибулозобисфосфатный путь автотрофной ассимиляции CO_2 , встречается у метилотрофных бактерий реже, чем РМФ- и сериновый пути, т.к. энергетически менее выгоден. Ключевыми ферментами этого пути являются фосфорибулокиназа и рибулозобисфосфаткарбоксилаза (РБФК/О или РубисКО). РБФ-цикл можно разделить на три этапа:

- 1) фиксация CO_2 ;
- 2) восстановление 3-фосфоглицерата до глицеральдегид-3-фосфата, катализируемое 3-фосфоглицераткиназой и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой;
- 3) регенерация первичного акцептора CO_2 – рибулозо-1,5-бисфосфата.

При этом возможны два варианта, отличающиеся путями превращения пяти молекул глицеральдегид-3-фосфата в три молекулы рибулозо-5-фосфата: перестройки могут проходить с участием трансальдозазы и транскетолазы, либо транскетолазы и седогептулозо-1,7-бисфосфатазы.



РубисКО может действовать и как оксигеназа в отсутствии CO_2 и наличии кислорода.



Продукт оксигеназной реакции, катализируемой РубисКО – фосфогликолат (ФГК) – через глиоксилат превращается в глицин, который затем может вовлекаться в сериновый путь.

Метилотрофные бактерии с рибулозобисфосфатным путем C_1 -ассимиляции: *Paracoccus* (Urakami et al., 1989), *Albibacter* (Doronina et al., 2001), *Xanthobacter* (Doronina, Trotsenko, 2003), *Beijerinckia* (Dedysh et al., 2005), *Angulomicrobium* (Доронина, 2006), *Hansschlegelia* (Ivanova et al., 2007), *Methylostratum* (Sorokin et al., 2007), *Methylovirgula* (Vorob'ev et al., 2009), *Ancylobacter* (Firsova et al., 2009), *Advenella* (Порошина и др., 2015).

Сериновый путь представляет собой цепь реакций, начинающихся с образования серина из глицина и формальдегида. Ключевые ферменты: сериноксиметилтрансфераза, серин-глиоксилатаминотрансфераза (СГАТ), оксипируватредуктаза (ОПР), глицераткиназа и малил-КоА-лиаза. Интермедиатами серинового цикла являются органические кислоты и аминокислоты. В результате из двух молекул ФА и одной молекулы CO_2 синтезируется одна молекула фосфоглицерата. В результате последующих превращений образуется 3-ФГК – стартовый метаболит для биосинтеза клеточных компонентов.

Изоцитратлиазоположительный (ицл⁺) вариант серинового пути (рис. 4). Некоторые факультативные метилотрофы с сериновым путем метаболизма окисляют ацетил-КоА в глиоксилат посредством реакций цитратного цикла с участием цитратсинтазы, аконитазы и изоцитратлиазы (ицл). Образующаяся при этом молекула глиоксилата также направляется в сериновый цикл. Ицл⁺-вариант серинового пути реализуют метилотрофы родов *Aminobacter* и *Hyphomicrobium*. Для них характерно наличие двух изоформ изоцитратлиазы, кодируемых различными генами и индуцируемых C_1 - или C_n -субстратами, соответственно (Троценко с соавт., 2010).

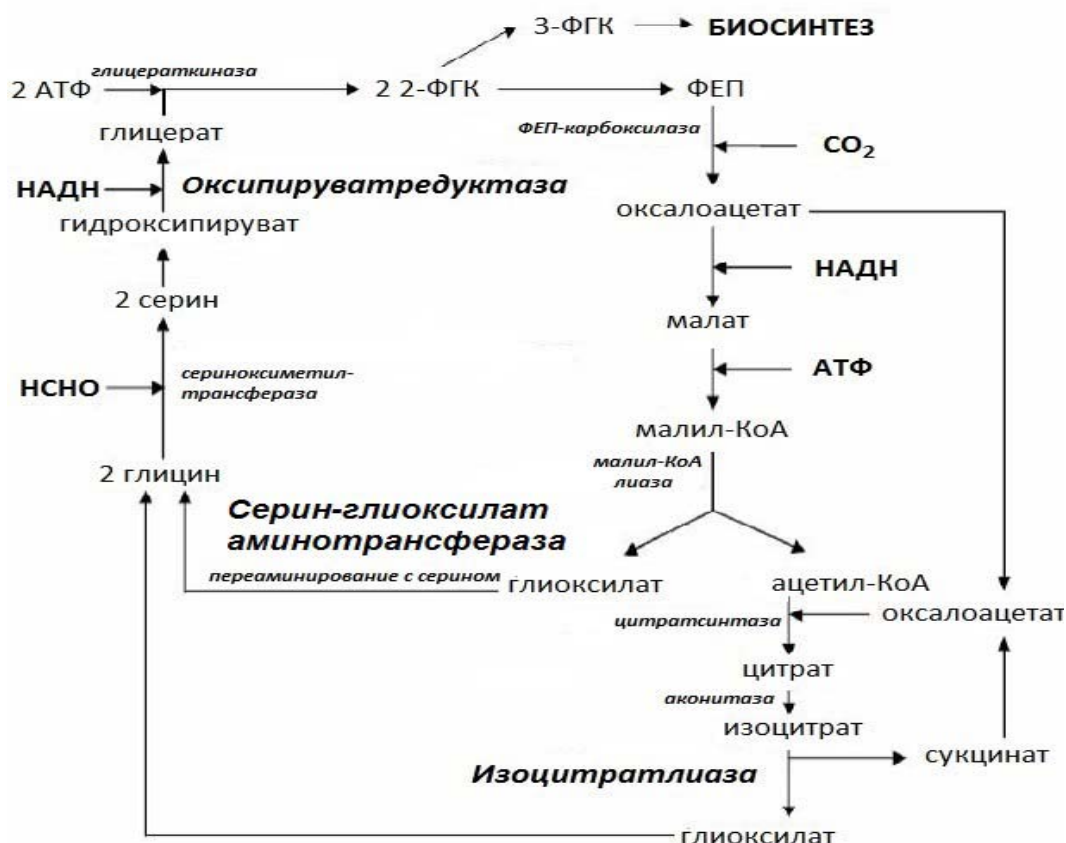
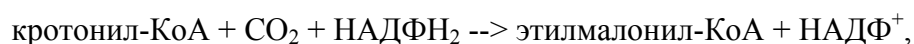


Рис. 4. Исоцитратлиазоположительный (icl⁺) вариант серинового цикла.

Исоцитратлиазоотрицательный (icl⁻) вариант серинового пути (этилмалонатный цикл регенерации глиоксилата) (рис. 5). Большая группа метилотрофов не имеет исоцитратлиазы и не способна превращать ацетил-КоА посредством реакций глиоксилатного шунта. Открытие новой уникальной биохимической реакции, катализируемой кротонил-КоА карбоксилазой/редуктазой:



позволило расшифровать пути конверсии ацетил-КоА в глиоксилат. Фермент является гомодимером (105 кДа), а кодирующий его ген *scr*, присутствует в геномах всех организмов, ассимилирующих ацетат (ацетил-КоА) без участия глиоксилатного шунта, включая *Methylobacterium extorquens* AM1 (Erb et al., 2007).

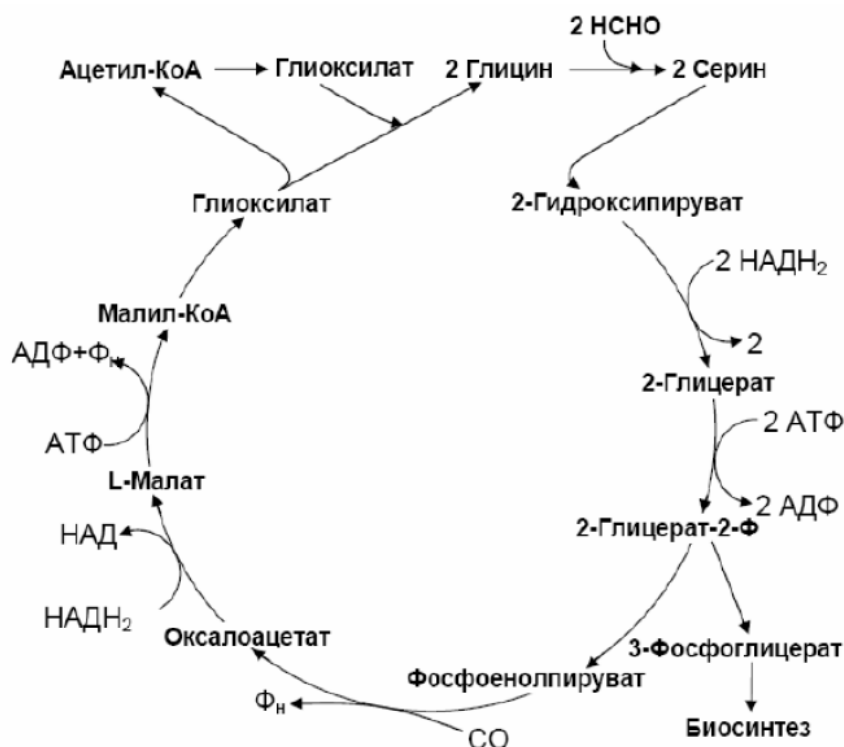


Рис. 5. Исоцитратлиазонегативный (ицл⁻) вариант серинового цикла.

Доказательства реальности цикла регенерации глиоксилата (этилмалонил-КоА пути) у метилотрофов были получены в классических исследованиях группы Ю. Ворхолт с использованием *M. extorquens* AM1 и высокоразрешающей масс-спектрометрии для демонстрации наличия большинства тиоэфиров, специфичных для этого пути (Peyraud et al., 2009) (рис.6). Кроме того, доказательства функционирования данного пути были получены в кратковременных ¹³C-пульсовых экспериментах, показавших последовательность реакций по порядку включения метки в предсказанные КоА-производные. Из этой работы стало ясно, что выращенные на метаноле клетки превращают метилсукцинил-КоА в глиоксилат и пропионил-КоА через мезаконил-КоА и метилмалил-КоА (Kiefer et al., 2008; Peyraud et al., 2009). Существенным преимуществом данного варианта серинового цикла является то, что он интегрирует различные метаболические пути, требующие глиоксилатный цикл, метилотрофию, биосинтез антибиотиков, синтез и распад полигидроксibuтирата (основного запасного материала многих прокариот) (Троценко с соавт., 2010).



Рис. 6. Схема этилмалонатного пути у *Methylobacterium extorquens* AM1 (Erb et al., 2007).

Метилотрофные бактерии с сериновым путем C_1 -ассимиляции: *Methylobacterium* (Patt et al., 1976), *Labrys* (Vasilyeva, Semenov, 1985), *Methylorhabdus* (Doronina et al., 1995), '*Methylosulfonomonas*' (Holmes et al., 1997), *Methylopila* (Doronina et al., 1998), *Ruegeria* (*Silicibacter*) (Uchino et al., 1998; Yi et al., 2007), *Methylarcula* (Doronina et al., 2000), *Hyphomicrobium* (McDonald et al., 2001; Borodina et al., 2002), *Afipia* (Moosvi et al., 2005), *Aminobacter* (Ian et al., 2005), *Granulibacter* (Greenberg et al., 2006), *Methyloversatilis* (Kalyuzhnaya et al., 2006), *Methylohalomonas* (Sorokin et al., 2007), *Methyloligella* (Doronina et al., 2013b), *Methylobrevia* (Poroshina et al., 2015).

Наиболее энергоемким путем ассимиляции C_1 -соединений является РБФ-цикл, поскольку синтез триоз осуществляется из CO_2 с затратой АТФ и восстановителей. Сериновый путь более эргономичен, чем РБФ-цикл, т.к. образование триоз в нем происходит из двух молекул формальдегида и одной молекулы CO_2 . Таким образом, метилотрофные бактерии могут реализовать три пути C_1 -ассимиляции, однако они выяснены не для всех таксонов метиловых бактерий (Schaefer et al., 2002; Moosvi et al., 2005).

1.2. Центральный метаболизм

Между путями первичного и центрального метаболизма C_1 -соединений у аэробных метилотрофных бактерий наблюдается определенная корреляция. Большинство факультативных метилотрофов обладает полным набором ферментов цикла трикарбоновых кислот, который при метилотрофном росте играет преимущественно биосинтетическую роль. Напротив, для многих облигатных и ограниченно-факультативных метилотрофов характерны множественные метаболические блоки в путях центрального метаболизма – отсутствие пируваткиназы, фосфоенолпируват-синтазы, пируватфосфатдикиназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и ферментов глиоксилатного шунта, наряду с функционированием специализированных механизмов трансформации энергии, обуславливающие их неспособность к росту на полиуглеродных соединениях (Троценко с соавт., 2010). Особенности центрального метаболизма аэробных метиловых бактерий с сериновым путем являются полное отсутствие или низкая активность ферментов катаболизма углеводов (гексокиназы, дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата, КДФГ-альдолазы), тогда как у метиловых бактерий с РМФ-путем эти ферменты играют существенную роль, т.к. участвуют в регенерации первичного акцептора формальдегида и образовании НАД(Ф)Н (Троценко с соавт., 2010).

1.3. Идентификация аэробных метилотрофных бактерий

Важная роль аэробных метилотрофных бактерий, осуществляющих трансформацию и деградацию C_1 -соединений, является причиной большого интереса к исследованию таксономического разнообразия, особенностей экофизиологии и метаболизма этих микроорганизмов, занимающих промежуточное положение между типичными автотрофами и гетеротрофами. Известно более 50 родов аэробных метилотрофных бактерий, относящихся к классам *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria, *Verrucomicrobia*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteriia* и реализующих сериновый, рибулозомонофосфатный или рибулозобисфосфатный пути C_1 -ассимиляции. В настоящее время продолжаются активные исследования таксономического и структурно-функционального разнообразия аэробных метилотрофов, в том числе, ассоциированных с растениями, т.к. долгое время представление о метиловых бактериях-фитосимбионтах ограничивалось бактериями рода *Methylobacterium*, а основные постулаты и концепции метилотрофии, в целом, были сформулированы для *Methylobacterium extorquens*, *Paracoccus denitrificans* и *Methylophilus methylotrophus* (Троценко с соавт., 2010).

Идентификацию бактериальных штаммов в настоящее время, как правило, производят путем сравнения их фенотипических, хемотаксономических и генотипических/молекулярных

характеристик (Ramasamy et al., 2014) с описанными ранее типовыми штаммами по надежным, воспроизводимым и информативным таксономическим схемам (Thompson et al., 2013). Важно отметить, что для метилотрофов, кроме всего прочего, необходимой специфичной фенотипической характеристикой при описании нового таксона является определение путей C_1 -метаболизма (табл. 1).

Таблица 1. Методология описания новых штаммов метилотрофных бактерий

Источник выделения
– физико-химические параметры: pH, соленость, температура
Фенотипическая характеристика
– форма клеток ^a , размеры клеток ^b (диаметр, длина), подвижность ^a и жгутикование ^b
– тип деления клеток (бинарное, почкование)
– тип клеточной стенки ^b (грамположительные, грамотрицательные)
– ультраструктура ^b (внутрицитоплазматические мембраны и включения)
– образование структур (капсулы, слизь, споры, цисты)
– запасные вещества ^b (полигидроксibuтират, гранулы гликогена)
Физиолого-биохимическая характеристика
– отношение к кислороду (аэробы или микроаэрофилы)
– источники углерода и азота
– тип питания (облигатные, ограниченно-факультативные, факультативные метилотрофы)
– pH область роста и оптимум
– концентрация NaCl для роста и оптимум
– температурная область роста и оптимум
– потребность в витаминах
– пути C_1 -метаболизма (определение активностей ключевых ферментов C_1 -окисления и ассимиляции)
Хемотаксономическая характеристика
– жирные кислоты
– полярные липиды (фосфолипиды)
– дыхательные липохиноны
– МАЛДИ анализ (идентификация по белковым профилям микроорганизмов)
Филогенетический анализ

- секвенирование гена 16S рРНК и построение филогенетического древа
- ДНК-ДНК гибридизация с наиболее близкими по филогенетическому положению типовыми штаммами видов
- полногеномное секвенирование
- секвенирование функциональных генов метилотрофии (метанолдегидрогеназы - *mxaF*, метиламиндегидрогеназы - *mauA*) и построение филогенетических деревьев по их транслированным аминокислотным последовательностям
- Г+Ц мол. % ДНК

Примечания: а – световая микроскопия; б – световая и электронная микроскопия; в – ультратонкие срезы клеток, электронная микроскопия.

Фенотипические методы включают описание и изучение основных морфологических и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов (Raineu, Oren, 2011). Метилотрофы обнаруживаются повсеместно, и к настоящему времени выделены метиловобактерии почвенных, пресноводных, морских экосистем, а также симбионты растений. Источник выделения микроорганизмов важен для дальнейшего прогнозирования физиологических свойств изолятов, таких как: отношение к кислороду, диапазоны температур, pH и солености, в некоторых случаях (изоляты из загрязненных биотопов) устойчивость к различным поллютантам и способность к их ассимиляции.

Метилотрофы представлены грамположительными и грамотрицательными клетками, палочками, кокками (делящимися бинарно) или гиообразующими (почкующиеся формы), подвижными или неподвижными клетками, имеющими один или более жгутиков, расположенных, как правило, униполярно, а также пигментированными и неокрашенными клетками. Многие метилотрофы способны синтезировать и накапливать природный биополимер – полигидроксибутират (ПГБ), причем бактерии с сериновым путем имеют общие с синтезом ПГБ интермедиаты и ферменты C₁-метаболизма. По типу углеродного питания метилотрофные бактерии разделены на три физиологические группы: облигатные метилотрофы используют только C₁-соединения, ограниченно-факультативные растут только на одном или нескольких полиуглеродных субстратах, тогда как типично факультативные метилотрофы хорошо растут как на C₁-, так и на C_n-субстратах (Anthony, 1982; Троценко с соавт., 2010). Некоторые метилотрофные бактерии не используют метанол. Эти организмы (например, *Methylobacterium* sp. 4-46) являются облигатными или факультативными метилотрофами, обладающими способностью утилизировать диметилсульфид, диметилсульфоксид, галометаны, моно-, ди- и триметиламины, тетраметиламмоний, формамид (Kolb, 2009). Изучение потребности изолятов в витаминах необходимо для определения оптимальных условий

культивирования, что является характерной особенностью некоторых таксонов метилотрофов. Так, многие представители рода *Methylophaga* проявляют ауксотрофность по витамину B₁₂ (Doronina et al., 2003), однако известны два штамма умеренно галофильных морских метилотрофных бактерий, *Methylophaga marina* КМ3 и КМ5, не зависящих от витамина B₁₂ и других ростовых факторов (Ли с соавт., 2007).

Энзимологический анализ путей C₁-метаболизма клеток, выращенных на C₁-соединениях, является необходимой специфичной физиолого-биохимической характеристикой при описании новых таксонов метилотрофных бактерий. Для определения путей первичной ассимиляции C₁-соединений определяют активности ферментов окисления метанола (PQQ-, НАД-зависимая метанолдегидрогеназы или никотинпротеин-метанолдегидрогеназа), метиламина (метиламиндегидрогеназа, метиламиноксидаза или ферменты N-МГ пути - γ -глутамилметиламидсинтетаза и N-метилглутаматсинтаза), формальдегида (формальдегиддегидрогеназа), формиата (формиатдегидрогеназа), для определения путей метаболизма C₁-соединений – активности ключевых ферментов РМФ, РБФ и серинового путей (таблица 2). Однако некоторые представители метилотрофных бактерий способны реализовать несколько вариантов путей утилизации C₁-соединений, например, *Hansschlegelia*, *Methylibium*, *Flavobacterium*, реализуют РБФ и сериновый (в миноре) пути. Также важно определить активности ферментов, участвующих в ассимиляции аммония, которая осуществляется через глутаматный цикл (глутаминсинтетаза и глутаматсинтаза) или восстановительное аминирование α -кетоглутарата (глутаматдегидрогеназы) (Троценко с соавт., 2010).

Хемотаксономическая характеристика – это, в сущности, часть фенотипической характеристики организма, включает описание химического состава клеточной стенки (для грамположительных бактерий – тип пептидогликана, тейхоевые кислоты, миколиновые кислоты и т.д.), наружной мембраны (жирные кислоты, полярные липиды, дыхательные хиноны, пигменты и т.д.) или составляющих цитоплазмы (полиамины) (Tindall et al., 2010).

Анализ жирных кислот клеточных стенок бактерий является одним из способов для разделения близкородственных видов бактерий, не имеющих явных отличительных фенотипических характеристик. Для получения достоверных результатов сравнительного анализа, условия роста бактерий и проведения исследования должны быть унифицированы (Da Costa et al., 2011). Таксономически значимые критерии: длина цепи, положение двойной связи и замещающих групп (Дегтева и др., 2001). Для РБФ-метилотрофов (*Angulomicrobium*, *Hansschlegelia*, *Ancylobacter*) характерно высокое содержание жирных кислот с нечетным количеством атомов углерода. У метиловых бактерий с сериновым путем C₁-метаболизма доминируют C_{18:1} кислоты, составляющие 60–80% от общего содержания жирных кислот, для РМФ-метилотрофов характерно преобладание C_{16:0} и C_{16:1} (Доронина, 1999).

Таблица 2. Ферменты и пути C₁-метаболизма некоторых представителей аэробных метилотрофных бактерий

<u>Ферменты РМФ пути</u>		<u>Ферменты РБФ пути</u>	<u>Ферменты серинового пути</u>	
Гексулозофосфатсинтаза		Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза /оксигеназа (РубисКо)	Серинглиоксилатаминотрасфераза, гидроксипируватредуктаза	
2-Кето-3-дезоксид-6- фосфоглюконатаальдолаза	Фруктозо-1,6- бисфосфатаальдолаза		Изоцитратлиаза	
<u>КДФГ-вариант РМФ пути</u>	<u>ФБФА-вариант РМФ пути</u>	Фосфорибулокиназа	<u>ИЦЛ⁺ - вариант серинового пути</u>	<u>ИЦЛ⁻ - вариант серинового пути</u>
<i>Methylobacillus</i>	<i>Amiclatopsis</i>	<i>Albibacter</i>	<i>Aminobacter</i>	<i>Methylarcula</i>
<i>Methylophaga</i>	<i>Acidomonas</i>	<i>Ancylobacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Methylophilus</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Angulomicrobium</i>	<i>Methylobrevia</i>	<i>Methylohalomonas</i>
<i>Methylovorus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Beijerinckia</i>		<i>Methylophila</i>
		<i>Hansschlegelia</i>		<i>Methylorhabdus</i>
		<i>Methylbium</i>		<i>Methyloversatilis</i>
		<i>Methylostrum</i>		<i>Methyloligella</i>
		<i>Methylovirgula</i>		
		<i>Paracoccus</i>		
		<i>Xanthobacter</i>		

Полярные липиды являются основными компонентами липидного бислоя мембран бактерий, обладают разнообразием структур и используются для целей классификации и идентификации. Полярные липиды прокариот – это не только фосфолипиды, но и гликолипиды и гликофосфолипиды, аминолипиды и серосодержащие липиды. *Alpha*-, *Beta*- и *Gammaproteobacteria*, как правило, имеют в своем составе три основных фосфолипида: фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин и дифосфатидилглицерин, а также, иногда – фосфатидилхолин (Da Costa et al., 2011). Таксономически существенные различия в фосфолипидном составе метилотрофов включают отношение концентраций фосфатидилхолина к фосфатидилэтаноламину, фосфатидилглицерина к дифосфатидилглицерину (кардиолипину), присутствие кардиолипина и минорных компонентов. Известно, что отличительным хемотаксономическим признаком облигатных и ограниченно-факультативных метилотрофных бактерий рода *Methylophilus* является отсутствие кардиолипина (Doronina et al., 2014).

Дыхательные хиноны широко распространены у аэробных и анаэробных представителей *Bacteria* и *Archaea*, делятся на две группы - бензохиноны (убихиноны, родохиноны и пластохиноны) и нафтохиноны (менахиноны, менатиохиноны, де-, ди- и мономенахиноны). Убихиноны – жирорастворимые (липофильные) коферменты, локализующиеся в липидной фазе мембраны и участвующие в «сборе» и переносе водорода и электронов на цитохромы, различаются по числу изопреновых единиц в боковой цепи (Q₇–Q₁₄); встречаются у представителей классов *Alpha*-, *Beta*- и *Gammaproteobacteria* (Tindall, 2005). Типичными для метилотрофных бактерий являются убихиноны Q₁₀ (*Acidomonas*, *Albibacter*, *Aminobacter*, *Hansschlegelia*, *Methylarcula*, *Methylopila*, *Methylorhabdus*, *Methylovirgula*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*), Q₉ (*Hyphomicrobium*) и Q₈ (*Methylibium*, *Methylobacillus*, *Methylophaga*, *Methylophilus*, *Methyloversatilis*, *Methylovorus*) (Троценко с соавт., 2010).

Важная информация о взаимном родстве бактерий может быть получена при изучении клеточных белков – продуктов трансляции генов. В настоящее время для решения задач идентификации микроорганизмов применяют метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (**MALDI-TOF/MS**). Он позволяет проводить прямой масс-спектрометрический анализ фракций рибосомных белков микробной клетки без фракционирования и очистки отдельных белков (прямое белковое профилирование) и получать уникальные для данного вида масс-спектры с высокой точностью и разрешением, характеризующие исследуемый объект по типу «отпечатков пальцев» (Tani et al., 2012). Рибосомные белки (“house-keeping”-белки) достаточно консервативны, что обеспечивает их таксономическую специфичность. В рамках процедуры идентификации происходит попарное сравнение пиков в спектре исследуемого образца с пиками эталонных.

суперспектров, находящихся в базе данных. Каждому сравнению с суперспектром в базе данных присваивается численный рейтинг, вычисленный на основании количества совпадений.

Идентификация микроорганизмов происходит по наибольшему совпадению, при этом не происходит идентификация конкретных белков (Sandrin et al., 2013). Показано, что с помощью метода MALDI-TOF/MS хорошо дифференцируются метиловобактерии рода *Methylobacterium* (Tani et al., 2012, 2015).

Генотипическая характеристика в бактериальной таксономии включает анализ последовательности гена 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизацию и молярного содержания Г+Ц пар в ДНК (Tindall et al., 2010). При классификации новых таксонов на уровнях рода и вида учитывают пороговые значения сходства последовательностей генов 16S рРНК, равные 95 и 98,65%, соответственно, по сравнению с их валидно опубликованными филогенетически наиболее близкими соседями (Tindall et al., 2010; Kim et al., 2014). Таким образом, генные последовательности 16S рРНК предоставляют первичное свидетельство того, что выделен новый вид (в том случае, если сходство последовательностей гена <98,65%). Там, где значения сходства последовательности гена 16S рРНК >98,65% (например, у представителей облигатных метилотрофов родов *Methylobacillus* и *Methylophilus* уровень сходства последовательности гена 16S рРНК выше 99%), должны быть использованы другие методы, например, ДНК-ДНК гибридизация, результаты которой, как правило, коррелируют с результатами анализа гена 16S рРНК (Stackebrandt et al., 2002; Richter, Rosselló-Móra, 2009), или анализ генных последовательностей с большим разрешением.

Метод ДНК-ДНК-гибридизации (ДДГ) является важным для оценки генетического родства бактерий, широко применяется как «золотой стандарт» для разделения бактериальных видов. Проведение ДДГ необходимо, если штаммы имеют более чем 97% сходства по последовательности гена 16S рРНК. Внутри одного вида бактерий уровень гомологии ДНК штаммов достигает 70-100%. Значение гомологии по данному методу <70% означает, что тестируемые бактерии принадлежат к разным видам (Tindall et al., 2010). Однако ДНК-ДНК гибридизация имеет ряд ограничений: 1) пороговые значения распространяются не на все роды прокариот; 2) определение ДНК-ДНК гибридизации требует специальных средств, имеющихся в ограниченном количестве лабораторий; 3) это трудоёмкий и дорогой способ, имеющий недостаточную воспроизводимость и отсутствие возможности постепенного создания сравнительной справочной базы данных (Tindall et al., 2010).

Дополнением к ДНК-ДНК гибридизации служит метод секвенирования последовательностей генов, кодирующих белки с консервативными функциями (“house-keeping”-генов). **RAPD-ПЦР** (от англ. random amplified polymorphic DNA) анализ – метод случайной амплификации полиморфной ДНК, заключается в амплификации фрагментов ДНК с

использованием коротких синтетических праймеров (около 10 п.н.). Полученные фрагменты (обычно размером 0,5-5 кб) разделяют в агарозном геле методом электрофореза, окрашивают бромистым этидием и детектируют наличие уникального для штамма/вида профиля. Полиморфизм продуктов амплификации ДНК включает характеристики трёх типов: длину фрагментов, наличие/отсутствие полосы и интенсивность свечения. Недостатки метода: низкая воспроизводимость результатов, обусловленная повышенной чувствительностью к условиям реакции: концентрации ионов магния, соотношению праймер/матрица, температурному режиму. Однако RAPD-анализ успешно применяется как экспресс-метод выявления генетического полиморфизма (Baker et al., 2002).

Полногеномное секвенирование позволяет заменить важные, но трудоемкие или не вполне точные методы идентификации более современными и надежными. Одним из таких методов является подсчет средней идентичности нуклеотидов (ANI) в геномах сравниваемых бактерий (достаточно 20% длины полной последовательности) (Richter, Rossello-Mora, 2009). Значение ANI 95–96% хорошо коррелирует с 70% уровнем ДНК-ДНК гибридизации – пороговым значением сходства ДНК штаммов, относимых к одному геномовиду (Goris et al., 2007; Richter, Rossello-Mora, 2009). Единственным недостатком секвенирования геномов в настоящее время является его высокая стоимость.

При описании метилотрофных бактерий также принято проводить филогенетический анализ аминокислотных последовательностей структурной части маркерного гена метилотрофии, кодирующего большую субъединицу МДГ – *mxaF*, ключевого фермента окисления метанола (Suzuki et al., 2009), либо его гомолога – гена *hoxF*. Ген *mxaF* весьма консервативен, поэтому разработанные праймеры позволяют детектировать этот белок у метилотрофов различного таксономического положения, а белок HoxF проявляет 50%-ную идентичность последовательности с каталитической субъединицей MxaF периплазматической МДГ (Beck et al., 2014). Также секвенируют структурную часть гена, кодирующего малую субъединицу МАДГ – *mauA*, наличие которого детектировано у представителей родов *Methylobacterium*, *Methylopila*, *Methylophilus*, *Blastobacter*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Methylobacillus* и *Methylophilus* (Доронина, 1999). Разработаны генетические маркеры, позволяющие детектировать метилотрофные бактерии: гены протеобактериальной метанолдегидрогеназы, ферментов ТГМП-пути (*fae*, *mtdB*, *mch*, *fhcD*), гены деградации хлорметана (*cmuA*) и дихлорметана (*dcmA*) (Vuilleumier et al., 2001; McDonald et al., 2002; Chistoserdova et al., 2009).

Таким образом, наряду с филогенетическим анализом описания ключевых физиолого-биохимических и хемотаксономических характеристик являются необходимыми условиями для идентификации новых метилотрофных изолятов.

2. Ассоциации аэробных метилотрофных бактерий с растениями

2.1. Разнообразие аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями

Аэробные метилотрофные бактерии широко распространены в природе и часто ассоциированы с растениями, с высокой плотностью колонизируют листовую поверхность, присутствуют в ризосфере, в семенах, почках, а также внутри тканей растений. Тесную ассоциацию метилотрофных бактерий с растениями объясняют функционированием «метанольного цикла», т.е. образованием и выделением растениями метанола, который активно используется аэробными метилотрофами как источник углерода и энергии. Метанол образуется при деметилировании пектина клеточных стенок под действием пектинметилэстеразы и является основным летучим органическим метаболитом, его эмиссия в атмосферу, по некоторым оценкам, достигает 10^{11} кг/год. К тому же, у активно растущих растительных клеток происходит элонгация клеточной стенки, требующая активного деметилирования пектина, поэтому у молодых клеток уровень образования метанола выше (Galbally, Kirstine, 2002; Kerpler et al., 2006). Из листьев метанол может испаряться через устьица, а также посредством эмиссии с кутикулы листьев. Метилотрофы в наибольшем количестве найдены на поверхности листьев, особенно на нижней стороне листовой пластинки, где расположено большинство устьиц – основного пути эмиссии метанола, а также проникают в межклеточное пространство и внутрь клеток растений (Poonguzhali et al., 2008; Iguchi et al., 2015).

Молекулярными методами исследования бактериальных популяций в филлосфере (анализ библиотек клонов ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК, автоматический анализ рибосомных межгенных участков, протеогеномный подход и параллельное пиросеквенирование) показано, что представители розовоокрашенных факультативных метиловых бактерий (РОФМ) рода *Methylobacterium* являются одной из доминирующих групп эпифитных и эндофитных бактерий (Delmotte et al., 2009; Ikeda et al., 2010; Knief et al., 2010). Представители этого рода – грамотрицательные, строго аэробные бактерии, способные расти как на одноуглеродных субстратах, таких как метанол, формальдегид, так и на многих других органических соединениях. Метилотрофы филлосферы характеризуются высокой выживаемостью при высушивании и замораживании на гигроскопичных носителях, устойчивостью к УФ и ионизирующему облучению, низкой влажности и высокой температуре (Доронина с соавт., 2001). Примечательно, что РОФМ сохраняют способность к репродукции после УФ-облучения в дозах, летальных для энтерококков, псевдомонад и метанотрофов (Романовская с соавт., 1998). Специфическая розовая окраска этих бактерий обусловлена синтезом каротиноидов, кроме которых представители данного рода способны синтезировать бактериохлорофилл. Синтез C_{40} -каротиноидов у розовоокрашенных метиловых бактерий

происходит из глицеральдегид-3-фосфата по общему для большинства бактерий пути синтеза изопреноидов через мевалонат-независимую продукцию изопентенил- и диметилаллилпирофосфата, затем конденсирующихся с образованием изопреноидных предшественников β -каротина, зеаксантина и астаксантина (Van Dien et al., 2003). Показано, что *Methylobacterium extorquens* AM1 (Van Dien et al., 2003) и *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T имеют восемь генов, кодирующих белки синтеза каротиноидов – *crtB* (МОС_2698 и МОС_3207), *crtF* (МОС_3185), *crtE/I* (МОС_3187, МОС_3208, МОС_5734 и МОС_5741) и *crtC* (МОС_3188), и ген, кодирующий эндонуклеазу для восстановления от УФ-повреждений (МОС_2537); также штамм CBMB20^T имеет три гена, кодирующих белки биосинтеза трегалозы – одного из наиболее распространенных соединений, защищающих клетки от высушивания; пять генов *csp* (*cspA*, МОС_0360 и МОС_5949; *cspB*, МОС_3103; *cspC*, МОС_0148 и *cspG*, МОС_5724), кодирующих белки холодового шока (Kwak et al., 2014). С использованием сканирующей электронной микроскопии выявлено, что микроколонии метиловых бактерий покрыты кутикулой или полисахаридами (Corpe, Rheem, 1989). Об этом также свидетельствует наличие у *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T 33 генов, ответственных за биосинтез экзополисахаридов, обеспечивающих защиту клеток при водном дефиците. Кроме того, идентифицированы два гена, связанные с биосинтезом белков адгезинов (Kwak et al., 2014). Продукты этих генов, вероятно, необходимы для поверхностного прикрепления и образования биопленок при колонизации растительных тканей (Gottig et al., 2009); гены, кодирующие такие белки, обнаружены у многих бактерий, ассоциированных с растениями (Van Sluys et al., 2002). Колонизация растений также может осуществляться с помощью систем кворумного взаимодействия (“quorum-sensing”) с использованием сигнальных молекул, таких как N-ацил-гомосеринлактоны (АГСЛ), регулируемые системами LuxI/LuxR (Camilli, Bassler, 2006). Штаммы метиловых бактерий способны продуцировать АГСЛ (Pomini et al., 2009), так у *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T обнаружено 17 генов, кодирующих семейство регуляторов транскрипции LuxR (Kwak et al., 2014), а у *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 - шесть длинноцепочечных гомосериновых лактонов (насыщенные гомологи (S)-N-додеканоил и (S)-N-тетрадеканоил-ГСЛ, N-тридеканоил-ГСЛ, (S)-N-(2E)-додеценоил-ГСЛ и редкие ненасыщенные гомологи (S)-N-(7Z)-тетрадеценоил и (S)-N-(2E, 7Z)-тетрадекадиенил-ГСЛ) (Pomini et al., 2009).

В настоящее время доказано, что метилотрофы постоянно ассоциированы с растениями и даже в зимний период локализованы внутри растительных тканей (Доронина с соавт., 2004). Ранее предполагали, что весной РОФМ колонизируют поверхность листьев, попадая на них с почвенной пылью (Романовская с соавт., 1996). Методом *in situ* гибридизации с 16S рРНК-специфичными олигонуклеотидными праймерами продемонстрирована локализация бактерий рода *Methylobacterium* в тканях почек сосны (*Pinus sylvestris* L.) (Pirttila et al., 2000).

Метилобактерии различного таксономического положения обнаружены в отобранных зимой образцах семян и почек липы, почек сирени, клена, яблони, хвой сосны и голубой ели. Показано, что колонизация растений в вегетационный период роста обусловлена главным образом развитием предсуществующих в растительных тканях метилотрофов, а локализация внутри растительных тканей обеспечивает этим бактериям лучшую выживаемость при низких и высоких температурах или при засухе (Доронина с соавт., 2004). Эксперименты с $\Delta mxaF$ (негативный мутант по синтезу большой субъединицы метанолдегидрогеназы) и $\Delta mptG$ (негативный мутант по синтезу тетрагидрометаноптерина) мутантами *M. extorquens* AM1 выявили, что метилотрофия даёт селективное преимущество в колонизации филлосферы по сравнению с немилотрофными эпифитами (Sy et al., 2005). У данного штамма имеет место кометаболизм метанола с альтернативными субстратами, так как он способен утилизировать целый набор различных органических субстратов при колонизации растений. Известно, что ферменты, участвующие в утилизации метанола, такие как метанолдегидрогеназа, ТГМП-зависимые ферменты, активны и синтезируются в отсутствие метанола, но в меньшем количестве (Chistoserdova et al., 1998). Очевидно, в природе доступность альтернативных органических субстратов для *Methylobacterium* зависит от конкуренции с другими бактериями, в том числе и не метилотрофными.

Различные виды РОФМ обнаружены в ассоциации с более чем 70 видами растений (Omer et al., 2004) и являются эндофитами (населяют ткани живых растений, не вызывая каких-либо негативных последствий для их функционирования и развития) таких растений как: конопля (Sy et al., 2001), арахис (Madhaiyan et al., 2006), эвкалипт (Andreote et al., 2009), табак (Andreote et al., 2009), хлопок (Madhaiyan et al., 2012.), клубника (Nasopoulou et al., 2014), цитрусовые (Ara'ujo et al., 2002) и хвойные (Pohjanen et al., 2014).

Несмотря на связь РОФМ со многими растениями, из филлосферы и ризосферы кукурузы выделялись преимущественно бесцветные метилотрофные бактерии родов *Methylovorus* и *Paracoccus*. Вполне вероятно, что для кукурузы – растения с C_4 -типом метаболизма, более характерна связь с иными, нежели РОФМ, метилобактериями (Доронина, Троценко, 2000; Доронина с соавт., 2000). Значимым событием явилось описание неокрашенного клубенькового симбионта *Methylobacterium nodulans*, образующего клубеньки у бобовых растений родов *Crotalaria* и *Lotononis* (Jourand et al., 2004). В настоящее время большинство описанных изолятов метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями, являются факультативными, нежели облигатными метилотрофами. В последнее десятилетие описаны виды следующих родов непигментированных облигатных или ограниченно-факультативных метилотрофов, выделенные из различных растений: *Hansschlegelia* – *H. plantiphila* (Ivanova et al., 2007), *H. beijingensis* (Zou et al., 2013); *Methylophilus* – *Mph. flavus*,

Mph. luteus (Gogleva et al., 2010), *Mph. glucosoxydans* (Doronina et al., 2012); *Methylobacillus* – *Mb. arboreus*, *Mb. gramineus* (Gogleva et al., 2011); *Methylovorus menthalis* (Doronina et al., 2011); *Methylopila musalis* (Doronina et al., 2013a). Однако, очевидно, что таксономическое разнообразие метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями, существенно шире.

2.2. Влияние аэробных метилотрофных бактерий на рост и развитие растений

Образование растениями различных C₁-соединений, прежде всего метанола, создает предпосылки постоянной метаболической взаимосвязи с ними метилотрофов. К настоящему моменту выделено большое количество метиловых бактерий, которые обладают одним или несколькими свойствами, позволяющими в определенных условиях стимулировать рост и развитие растений, улучшать прорастание семян, сохранять их всхожесть, в том числе и в ассоциации с другими группами бактерий (Holland, 1997; Lee et al., 2010; Nalayani et al., 2014). Благодаря этим способностям, метилотрофы имеют большой потенциал для применения в сельском хозяйстве. В последнее время появилось множество сообщений о повышении урожайности различных культур растений после обработки РОФМ: риса (Poonguzhali et al., 2008), томатов, красного перца (Yim et al., 2012), картофеля (Ardanov et al., 2016), хлопка, сахарного тростника (Madhaiyan et al., 2006a), арахиса (Madhaiyan et al., 2006b), пшеницы (Meena et al., 2012) и др. Показано, что колонизация гнотобиотических растений *in vitro* метиловыми бактериями повышала всхожесть семян, способность к корнеобразованию, фотосинтетическую активность, скорость роста и регенерационный потенциал (Каляева с соавт., 2001, 2003; Троценко с соавт., 2001). У колонизированных непигментированными метиловыми бактериями растений также повышалась устойчивость к фитопатогену *Erwinia carotovora*, что может быть следствием биосинтеза антибиотиков или ферментов, лизирующих клеточные стенки грибов, связывания железа в ризосфере, индуцированной системной устойчивости растений, а также конкуренции за места связывания на корнях (Пиголева с соавт., 2009; Vorholt, 2012; Ardanov et al., 2012). Более того, преинокуляция метиловыми бактериями снижала развитие прикорневой гнили, вызываемой фитопатогенным грибом *Rhizoctonia solani* у растений риса, и на 26% уменьшала поражение тканей томата фитопатогеном *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* по сравнению с необработанными контрольными растениями (Madhaiyan et al., 2004; Indiragandhi et al., 2008). В опытах по колонизации метилотрофными бактериями *Methylovorus mays* табака, картофеля и льна-долгунца, размножаемых *in vitro*, инокуляция приводила к повышению скорости регенерационного роста даже при культивировании на средах без витаминов, а также способности к корнеобразованию у растений (Каляева с соавт., 2001). При колонизации метиловыми бактериями эксплантов табака возрастала эффективность регенерации, а побегообразование начиналось на 4-5 суток раньше по сравнению с

контрольными. В исследованиях по взаимодействию растений табака (*Nicotiana tabacum* L.), томата (*Solanum lycopersicum* Mill.), капусты (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), рапса (*Brassica napus* L.) и хрустальной травки (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) с бактериями *Methylovorus mays* в опытах *in vitro* и *in vivo* показана стабильная ассоциация этих микроорганизмов с растениями. Колонизированные растения отличались ускоренным ростом, лучшим укоренением, адаптацией к условиям *in vivo* и повышенной устойчивостью к грибным фитопатогенам (*Sclerotinia sclerotiorum* и *Phytophthora infestans*) (Захарченко с соавт., 2012). Одним из интересных предложений применения подобных технологий культивирования является колонизация метилотрофными бактериями овощных растений, используемых в оранжереях на космических кораблях. Колонизация растений в таких оранжереях облигатными метилотрофами *Methylovorus mays* стимулировала их рост и развитие, индуцировала в них системную устойчивость к фитопатогенам (*Fusarium oxysporum*), а также создавала биофильтр, предотвращающий поступление образуемых растениями C₁-соединений в герметичное помещение и поглощающий C₁-соединения техногенного и биогенного происхождения (Доронина с соавт., 2009). Дополнительное преимущество использования облигатных метилотрофных бактерий в том, что они не вызывают порчу пищевых и других продуктов, непатогенны для человека, животных и растений. В отличие от гетеротрофов, они не развиваются на твердых средах, используемых для культивирования растений *in vitro*. В связи с этим облигатные метилотрофы перспективны при разработке новых биотехнологий культивирования трансгенных растений, микроразмножения и регенерации гнотобиотических растений, с последующей адаптацией к условиям открытого грунта или замкнутых экосистем.

Исходя из многочисленных сообщений о положительном влиянии метилотрофов на прорастание семян, рост и развитие растений, очевидно, что метиловобактерии реализуют различные стратегии влияния на рост растений. Известно, что представители метилотрофов стимулируют рост растений, путем синтеза растительных гормонов, таких как ауксины, цитокинины, образуя дезаминазу 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты, что снижает содержание этилена – гормона старения растений, а также синтезируют витамин B₁₂, сидерофоры, фиксируют атмосферный азот, способствуют солюбилизации фосфора, улучшая тем самым минеральное питание растений.

3. Механизмы фитосимбиоза

3.1. Синтез фитогормонов

Фитогормоны – это низкомолекулярные органические соединения небелковой природы, которые действуют в очень низких концентрациях (10^{-5} - 10^{-11} М) на некотором расстоянии от места их биосинтеза, включая и регулируя целые физиологические программы (Полевой, 1982). Фитогормоны занимают центральное положение в регуляции роста и дифференциации растений в целом, а также в системах культуры клеток и тканей, координируют различные пути передачи сигналов во время реакций абиотического стресса, являются своего рода сигнальной системой для координации роста и развития растений. Фитогормоны обычно делят на 5 групп: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота и этилен. Однако в настоящее время к ним также относят жасмоновую, салициловую кислоты, брассиностероиды и стриголактоны (рис. 7) (Neumann et al., 2009; Wani et al., 2016).

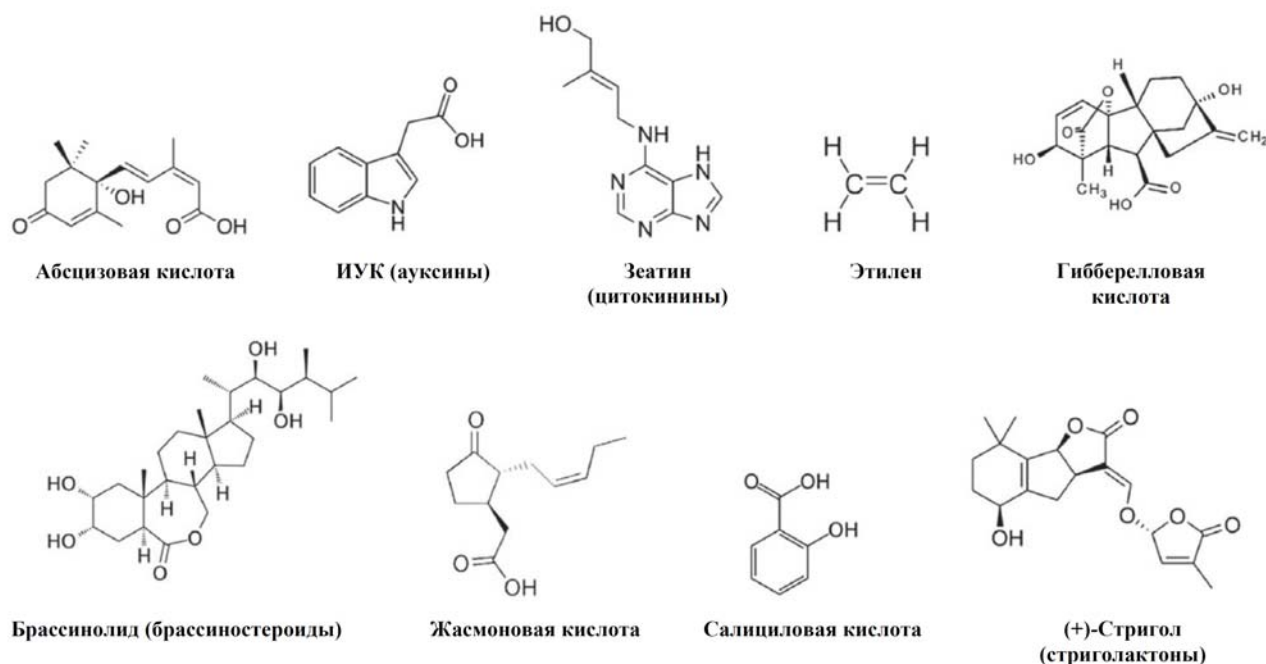


Рис. 7. Структурные формулы фитогормонов.

Многие микроорганизмы, ассоциированные с растениями, способны синтезировать вещества фитогормональной природы, необходимые им как для собственного развития, так и для установления связей с растениями и другими микроорганизмами. Образование гормонов – одно из важных свойств ризосферных, эпифитных и симбиотических бактерий, стимулирующих рост растений (Цавкелова с соавт., 2006).

3.1.1. Ауксины

Ауксины – это класс растительных гормонов, производных индола, образующихся в апикальных меристемах растений. Один из наиболее распространенных ауксинов – индолил-3-уксусная кислота (**ИУК**), предшественником которой является триптофан. Кроме ИУК, в растениях найдены и другие индольные вещества, которые можно рассматривать как предшественники ИУК – индолилпириновиноградная (**ИПвК**), индолилмолочная (**ИМК**) кислоты, индолилацетонитрил, индолилацетальдегид, триптамиин, триптофол, либо как продукты ее дальнейшего превращения. Активность индольных соединений может быть обусловлена либо их превращением в ИУК, либо собственной активностью, которая зависит от их химического строения. ИУК вызывает разнообразные физиологические эффекты у растений: стимулирует деление, растяжение и дифференциацию клеток, необходима для образования проводящих пучков и тканей, т.к. превращает паренхимные клетки ксилемы и флоэмы, стимулирует корнеобразование, регулирует опадание листьев и индуцирует закладывание корней в культуре тканей (Троценко с соавт., 2001). Интересно, что появляется все больше доказательств того, что ИУК играет роль в адаптации растений к солевому стрессу (Iqbal et al., 2014; Fahad et al., 2015), улучшает рост корней и побегов растений, произрастающих в условиях засоленности или загрязнения тяжелыми металлами (Sheng, Xia, 2006; Egamberdieva, 2009). Ауксины рассматривают как важную составляющую защитных реакций посредством регуляции многочисленных генов и перекрестных реакций между абиотическими и биотическими стрессовыми ответами (Fahad et al., 2015). Ауксины стимулируют транскрипцию большого количества генов, называемых генами первичного ауксинового ответа; эти гены идентифицированы и охарактеризованы у нескольких видов растений, включая рис, арабидопсис и сою (Javid et al., 2011).

Способность к биосинтезу ИУК обнаружена у всех высших растений, многих водорослей, грибов, а также широко распространена среди эпифитных и почвенных микроорганизмов (например, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) (Patten, Glick, 2002; Boiero et al., 2007; Kumaran, Elango, 2013), которые могут оказывать как положительное влияние на растения, так и отрицательное, когда ИУК выступает как фактор патогенности (Fett et al., 1987). Ауксины синтезируют также аэробные метилотрофные бактерии различных родов (при добавлении в среду L-триптофана): *Hansschlegelia*, *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium*, *Methylopila*, *Methylarcula*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Methylophaga*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Albibacter*, *Ancylobacter*, *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* (Доронина с соавт., 2002; Ivanova et al., 2007; Kwak et al., 2014). Метилотрофные бактерии различаются по количеству выделяемых в среду индольных соединений (от 5 до 120 мкг/мл). Индольные соединения, выделенные из

Methylobacterium mesophilicum, *Albibacter aminovorans*, *Methylovorus* *mayi*, *Paracoccus kondratievae* идентифицированы как ИУК, ИМК или ИПвК, а у бактерий с сериновым путем C₁-метаболизма найден также инлолил-3-ацетамид. При этом отмечено ингибирование синтеза ИУК ионами аммония, вероятно, вследствие конкуренции ионов аммония с аминогруппами триптофана, элиминирующимися в процессе биосинтеза ИУК (Троценко с соавт., 2001).

Известны четыре пути биосинтеза ИУК из триптофана микроорганизмами: индолил-3-пируватный, индолил-3-ацетамидный, триптаминовый и индолил-3-ацетальдегидный (рис. 8).

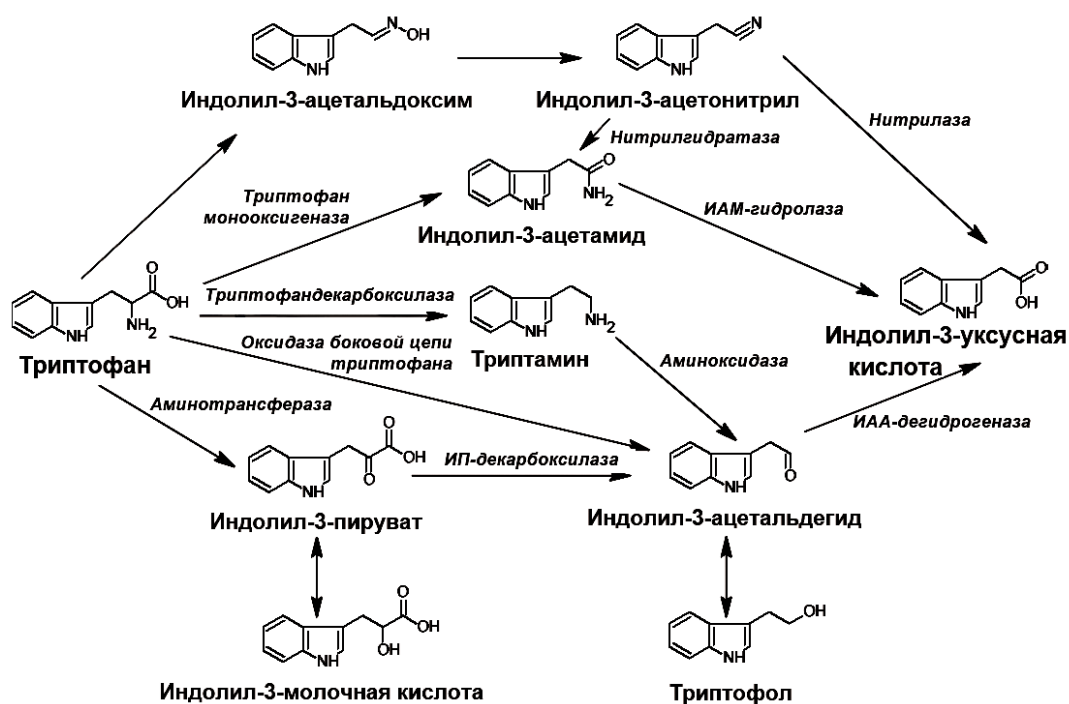


Рис. 8. Пути биосинтеза ИУК из триптофана у бактерий (Spaepen et al., 2007).

ИАА – индолил-3-ацетальдегид, ИАМ – индолил-3-ацетамид, ИП – индолил-3-пируват.

Индолил-3-пируватный путь. Интермедиаты индолилпируватного (ИПвК) пути найдены у растений и микроорганизмов, однако ферменты, осуществляющие биосинтез ИУК посредством этого пути в растениях, не обнаружены. ИПвК-путь реализуют бактерии, ассоциированные с растениями: *Enterobacter cloacae*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas putida*, а также некоторые непатогенные штаммы *Erwinia herbicola* (Koga et al., 1991; Costacurta, Vanderleyden, 1995; Patten, Glick, 1996; Manulis et al., 1998). Ключевой фермент ИПвК-пути – индолил-3-пируватдекарбоксилаза (**IpdC**, К.Ф. 4.1.1.74), очищен и охарактеризован у *A. brasilense*, *E. cloacae* и *Mycobacterium tuberculosis*. С одной стороны, ферменты из разных бактерий различаются по аминокислотной последовательности, и, как следствие, по субстратной специфичности, хотя все они декарбоксилируют индолилпируват. С другой стороны, фермент из *A. brasilense* декарбоксилирует фенилпируват с большей каталитической эффективностью, поэтому для него предложили название фенилпируватдекарбоксилаза (К.Ф.

4.1.1.43). Фермент из *Myc. tuberculosis* условно назван декарбоксилазой α -кетокислот, благодаря способности декарбоксиллировать широкий спектр алифатических и ароматических кислот (Koga et al., 1995; Schuetz et al., 2003; Spaepen et al., 2007; Werther et al., 2008). У *A. brasilense* делеция гена *ipdC*, кодирующего индолилпируват-декарбоксилазу, привела к 90%-ному снижению уровня индолилацетата в культуральной жидкости. Следовательно, ИПвК-путь биосинтеза ИУК у данной бактерии доминирует (Prinsen et al., 1993). Поиск генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза ИУК в геноме метилотрофа *Methylobacterium extorquens* AM1 выявил ген, кодирующий тиаминпирофосфат-зависимую декарбоксилазу α -кетокислот, проявляющую сходство с индолилпируватдекарбоксилазами. В результате клонирования гена *ipdC* был получен высокоочищенный рекомбинантный фермент, способный декарбоксиллировать бензоилформиат с максимальной скоростью (k_{cat}). В реакции с индолилпируватом этот фермент имел наибольшую константу специфичности (k_{cat}/K_m), что позволило классифицировать его как индолил-3-пируватдекарбоксилазу. Нокаут-мутант *M. extorquens* по гену *ipdC*, выращенный в присутствии триптофана, синтезировал на 54% меньше ИУК, чем штамм дикого типа. Комплементация мутации приводила к увеличению содержания ИУК в культуральной жидкости по сравнению с мутантом (Федоров с соавт., 2010).

Индолил-3-ацетамидный путь. Интермедиаты этого пути обнаружены у многих фитопатогенных бактерий: *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia herbicola*, а также у непатогенных представителей *Bradyrhizobium* и *Streptomyces*. Считается, что индолилацетамидный путь биосинтеза ИУК осуществляется только бактериями, хотя в ряде работ сообщалось о наличии индолилацетамида в тканях стерильно выращенных растений (Kawaguchi et al., 1993; Saotome et al., 1993; Pollmann et al., 2002). Ключевым ферментом индолилацетамидного пути является ФАД⁺-зависимая триптофан-2-монооксигеназа (К.Ф. 1.13.12.3) с молекулярной массой 64 кДа. Фермент кодируется геном *iaaM* и хорошо изучен у псевдомонад. Нуклеотидная последовательность гена *iaaM* проявляет высокую гомологию с локусом *tmsI* в т-ДНК агробактерий (Emanuele et al., 1995).

Триптаминовый путь, наряду с ИПвК-путем, является основным путем биосинтеза ауксинов в растениях, поскольку ключевой фермент – триптофандекарбоксилаза (декарбоксилаза ароматических аминокислот, К.Ф. 4.1.1.28) – хорошо изучен у многих растений (Facchini et al., 2000). В то же время остаются неясными этапы окисления триптамина. У бактерий показана триптофандекарбоксилазная активность, однако охарактеризован только фермент из *Micrococcus perditreus* (Nakazawa et al., 1981). Несмотря на то, что многие бактерии, в отличие от растений, способны напрямую окислять триптамин до индолилацетальдегида за счет активности аминоксидазы, функционирование триптаминового пути биосинтеза ИУК у прокариот не доказано (Spaepen et al., 2007).

Индолил-3-ацетальдегидный путь. Ключевой фермент этого пути – оксидаза боковой цепи триптофана (TSO, **T**rp-**s**ide chain **o**xidase, К.Ф. 1.13.99.3) – обнаружен только у *Psudomonas fluorescens*. TSO катализирует окисление триптофана с образованием индолил-3-ацетальдегида (**ИАА**), который затем окисляется при помощи ИАА-дегидрогеназы (Oberhaensli et al., 1991).

База данных путей KEGG иллюстрирует полный путь биосинтеза ИУК у *Methylobacterium nodulans*, *Methylobacterium* sp. 4-46, *Xanthobacter autotrophicus* из триптофана через триптамин и ИАА с помощью ферментов: триптофандекарбоксилазы, аминоксидазы и ИАА-дегидрогеназы. *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T также имеет гены, кодирующие аминоксидазу (MOC_0996, MOC_3058 и MOC_3474) и альдегиддегидрогеназу (MOC_0153, MOC_0181, MOC_0592, MOC_2514, MOC_5534 и MOC_6112), но ген, кодирующий триптофандекарбоксилазу, не обнаружен. Этот фермент представляет собой белок семейства аминотрансфераз аспартата, которые содержат сайт связывания пиридоксальфосфата. Однако поскольку *M. oryzae* CBMB20^T имеет гены, кодирующие аспартат-аминотрансферазу (MOC_2191) и β -элиминирующую лиазу/треонин-альдолазу ароматических аминокислот (MOC_0009), предположили, что одна из них может служить функцией, аналогичной функции триптаминдекарбоксилазы (Kwak et al., 2014).

Интересно, что в настоящее время ИУК рассматривается и как сигнальная молекула бактерий (Федоров с соавт., 2011). Добавление ауксина в среду для выращивания *Methylobacterium extorquense* AM1 увеличило активности ферментов первичного C₁- и центрального метаболизма, особенно у мутанта *M. extorquense* AM1 *DipdC* с нарушенным биосинтезом ИУК (Федоров с соавт., 2009). Следовательно, это соединение может служить регулятором метаболизма бактерий в условиях эпифитного роста.

3.1.2. Гиббереллины

Гиббереллины – тетрациклические дитерпеноидные кислоты, производные *ent*-каурена. Фитогормоны гиббереллины участвуют в процессах физиологического развития растений, включая прорастание семян, удлинение стеблей, рост листьев, ускорение образования цветов и плодов (Bottini et al., 2004), ингибируют образование бутонов у древесных покрытосеменных, задерживают процессы старения у ряда видов растений, а также участвуют в адаптации растений к абиотическим стрессам (Vettakkorumakankav et al., 1999). В последнее время появилось множество работ, подтверждающих взаимосвязь между GA-сигналингом (посредством DELLA-белков) и стрессоустойчивостью растений (Achard et al., 2008; Masood et al., 2016). DELLA-белки являются репрессорами отклика растений на гиббереллины. Установлено, что ответ растений на гиббереллины зависит от деградации DELLA-белков, которые при отсутствии сигнала конститутивно связаны с промоторами гиббереллин-

регулируемых генов. Так, мутанты растений с потерей функций генов, кодирующих DELLA-белки, обладают повышенной чувствительностью к гиббереллинам, напротив, мутанты с усилением их функций и трансгенные растения со сверхэкспрессией генов DELLA-белков – карлики (Vera-Sirera et al., 2015).

Известно более 130 структурных форм гиббереллинов, синтезируемых различными грибами, растениями и бактериями, но только 4 из них являются биоактивными – это GA₁, GA₃, GA₄ и GA₇ (Yamaguchi, 2008). Впервые гиббереллины были обнаружены у гриба, патогена риса, *Fusarium moniliforme* (ранее *Gibberella fujikuroi* или *Fusarium fujikuroi*) (Kurosawa, 1926), а затем у растений (GA₁) в семенах *Phaseolus coccineus* (MacMillan, Suter, 1958). Однако гибберелловая кислота синтезируется не только растениями и грибами (MacMillan, 2002), но и бактериями (Bottini et al., 2004). Поиск гиббереллинов бактерий изначально проводили с использованием физико-химических методов и обнаруживали только у бобовых симбионтов семейства *Rhizobiaceae*. В настоящее время способность к синтезу гиббереллинов известна у некоторых бактерий, стимулирующих рост растений (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* и *Bradyrhizobium*) (Perrig et al., 2007; Morrone et al., 2009), что было продемонстрировано методами ТСХ, биотестов и ВЭЖХ-УФ; с помощью ГХ-МС синтез гиббереллинов был подтвержден у *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (Bastian et al., 1998) и *Bacillus* sp. (Gutierrez-Manero et al., 2001).

У высших растений биосинтез гиббереллинов начинается с циклизации геранилгеранилдифосфата (GGPP) – основного предшественника гиббереллинов (рис. 9). После циклизации геранилгеранилдифосфата образуется *ent*-каурен, синтез осуществляется в две реакции с помощью ферментов: копалилдифосфатсинтазы (CPS), которая катализирует синтез *ent*-копалилдифосфата (*ent*-CPP), и *ent*-кауренсинтазы (KS), катализирующей образование *ent*-каурена. Серией окислительных реакций *ent*-каурен превращается в настоящие гиббереллины. Цитохром P450-зависимая монооксигеназа (P450) приводит к образованию *ent*-кауреновой кислоты, а затем первого гиббереллина GA₁₂-альдегида, который преобразуется в GA₉ либо в GA₅₃. Конечной стадией образования биоактивных гиббереллинов в растениях является 3β-гидроксилирование GA₉ и GA₅₃ с образованием GA₄ либо GA₁ и GA₃, соответственно (Cassan et al., 2001; Tudzynski, Bumke, 2009).

У грибов путь биосинтеза гиббереллинов похож на путь у высших растений, однако отличается некоторыми генами и ферментами. У *F. fujikuroi* P450 также катализируют окисление *ent*-каурена в *ent*-кауреновую кислоту, а далее в GA₁₄, в отличие от растений (рис. 8). Для образования биоактивных гиббереллинов растения используют 2-оксиглутаратзависимые диоксигеназы (2ODD), тогда как грибы используют дополнительные P450, а образование 1,2-двойной связи GA₃ у *F. fujikuroi* происходит с участием десатуразы (фермент, катализирующий

превращение одинарной связи между атомами углерода в ацильных цепях (C-C) в двойные связи (C=C)). Различия между биосинтезом гиббереллинов у растений и грибов наглядно демонстрируют, что соответствующие пути в этих двух группах организмов имеют независимое происхождение (Yamaguchi, 2008).

Существует множество данных о ферментах и их роли в биосинтезе гиббереллинов у растений и грибов, но о бактериальном биосинтезе гиббереллинов известно немного. В исследованиях путей биосинтеза гиббереллинов у *Azospirillum lipoferum* и *Azospirillum brasilense* показано, что первые стадии регулируются с помощью цитохром P450-зависимых монооксигеназ (Tully et al., 1998; Cassán et al., 2001), а поздние стадии гидроксилирования – 2-оксоглутарат-зависимыми диоксигеназами (2ODD), как и у высших растений (Cassán et al., 2001).

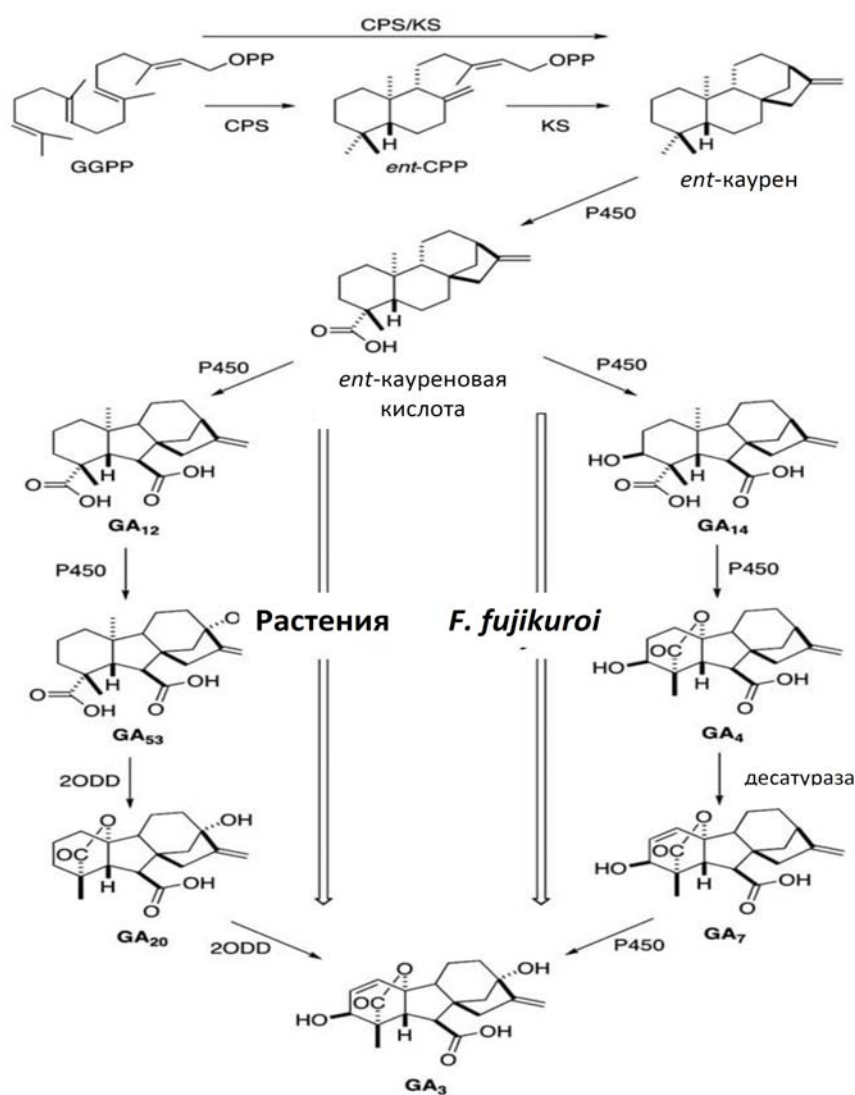


Рис. 9. Схематическая последовательность реакций биосинтеза гибберелловой кислоты GA_3 у растений и гриба *Fusarium fujikuroi* (Morrone et al., 2009). GGPP – геранилгеранилдифосфат, CPS – копалилдифосфатсинтаза, KS – ent-кауренсинтаза, 2ODD – 2-оксиглутаратзависимая диоксигеназа, CPP – копалилдифосфат.

У *Bradyrhizobium japonicum*, синтезирующих гиббелловую кислоту GA₃, в опероне, который предположительно кодирует ферменты биосинтеза гиббереллинов, обнаружены 2 гена: *blr2149* (BjCPS), кодирующий *ent*-копалилдифосфат-специфичную *ent*-копалилдифосфатсинтазу, и *blr2150* (BjKS), кодирующий *ent*-кауренсинтазу (рис. 10) (Morrone et al., 2009). Это первая *ent*-копалилдифосфатсинтаза идентифицированная у бактерий, более того, совместной активности этих генов достаточно для получения промежуточного соединения *ent*-каурена, необходимого для биосинтеза гибберелловой кислоты GA₃.

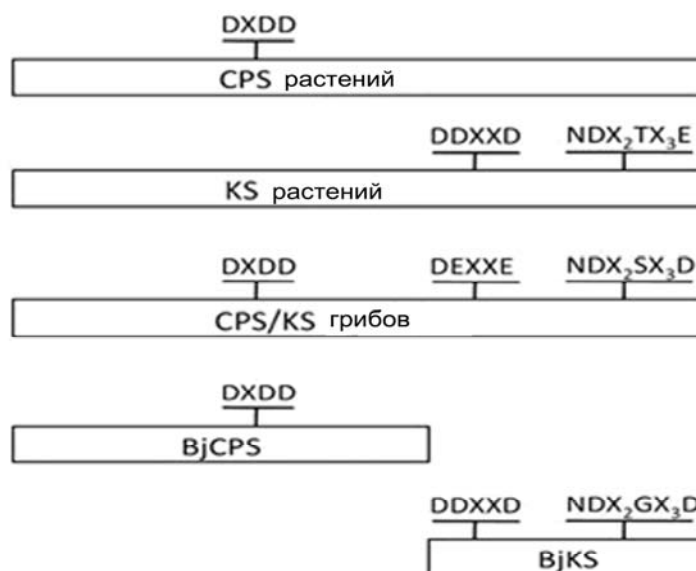


Рис. 10. Схематическое расположение генов дитерпеновых синтаз растений, грибов и бактерий *Bradyrhizobium japonicum* (Morrone et al., 2009). CPS – копалилдифосфатсинтаза, KS – *ent*-кауренсинтаза, BjCPS – копалилдифосфатсинтаза *Bradyrhizobium japonicum*, BjKS – *ent*-кауренсинтаза *Bradyrhizobium japonicum*.

Секвенирован кластер из 3 участков генов цитохром P450-зависимых монооксигеназ (CYP112, CYP114, и CYP117) у *Bradyrhizobium japonicum*, а также часть гена CYP115P (Tully et al., 1998). Хотя биохимическая функция продуктов этих генов неизвестна, имеется сходство с другими генами оперона, участвующего в синтезе терпеноидов у растений и генов синтеза *ent*-кауренсинтазы у *F. fujikuroi* (Bottini et al., 2004). Интересно, что BjCPS и BjKS, содержащиеся в опероне, имеют только три полноразмерных P450, а также короткоцепочечную алкогольдегидрогеназу, что указывает на некоторые сходства с биосинтезом гиббереллинов у грибов, то есть без использования 2ODD в отличие от *Azospirillum lipoferum* и *Azospirillum brasilense*. При этом между P450 *F. fujikuroi* и *B. japonicum* менее 15% сходства на уровне аминокислотной последовательности. Более того, по-видимому, *B. japonicum* использует только три P450 для синтеза GA₃, тогда как у *F. fujikuroi* используются четыре P450. С этой гипотезой согласуются данные, что некоторые другие ризобактерии, синтезирующие гиббереллины также

содержат только три Р450. Также в этих оперонах имеется короткоцепочечная алкогольдегидрогеназа, активность которой отличается от десатуразы, участвующей в биосинтезе GA₃ у *F. fujikuroi*. Следовательно, биосинтез биоактивной GA₃ у бактерий представляет собой еще один альтернативный путь образования гиббереллинов, существенно отличающийся от таковых у растений и грибов.

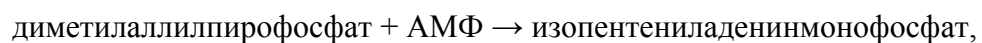
Кроме того, на *Azospirillum* sp. продемонстрировано, что бактерии могут образовывать гиббереллины *in vitro* (Piccoli, Bottini, 1994), а также в ассоциации с высшими растениями (Cassan et al., 2001). Инокуляция карликового риса, неспособного синтезировать гиббереллины, диазотрофными бактериями рода *Azospirillum* существенно стимулировала рост растений. Данный эффект связали со способностью бактерий метаболизировать экзогенно добавленную GA₂₀ в биологически активную форму GA₁ (Моргун с соавт., 2009).

Пиртилла с соавторами (Pirtilla et al., 2004) исследовали наиболее известного представителя РОФМ *Methylobacterium extorquens* на способность к синтезу гиббереллинов масс-спектрометрическим методом, но гиббереллины не были обнаружены. Позднее наличие гибберелловой кислоты в культуральной жидкости аэробных метилотрофных бактерий выявили спектрофотометрическим методом у представителя рода *Methylobacterium* – *M. oryzae* CBMB20^T (Siddikee et al., 2010), однако структура гибберелловой кислоты не была доказана.

3.1.3. Цитокинины

Цитокинины – один из классов гормонов, производных аденина, содержащих в N-6 положении пуринового кольца заместитель, структура которого может варьировать, определяя физиологическую активность цитокининов. Фитогормоны цитокинины полифункциональны и регулируют многие физиологические процессы: стимулируют деление растительных клеток, снимают апикальное доминирование, прерывают период покоя спящих почек, стимулируют прорастание семян, задерживают старение срезанных листьев; повышают устойчивость клеток к различным неблагоприятным условиям: высоким и низким температурам, обезвоживанию, грибной и вирусной инфекциям, механическим воздействиям, токсичным химическим агентам (Троценко с соавт., 2001; O'Brien, Bencova, 2013; Fahad et al., 2015).

Известно несколько источников цитокининов в клетке. Синтез *de novo* у микроорганизмов, в основном, осуществляется изопентенилтрансферазами, катализирующими реакцию:



который затем модифицируется и приводит к образованию изопентениладенозина, изопентениладенина, зеатинрибозида и зеатина (Kakimoto, 2003). Альтернативный или непрямой биосинтез цитокининов осуществляется путем изопентенилирования аденинового

основания, прикрепленного к антикодоновой петле некоторых тРНК. Данную реакцию катализирует тРНК-изопентенилтрансфераза, кодируемая геном *miaA*, причем источником изопентенильной группы служит мевалоновая кислота. При деградации такой тРНК цитокинины переходят в свободную форму. В большинстве случаев при деградации тРНК образуются неактивные *цис*-изомеры зеатина, в отличие от активных *транс*-изомеров, синтезируемых *de novo*. Известны примеры образования *транс*-изомеров зеатина при деградации тРНК (Koenig et al., 2002; Kakimoto, 2003).

У метилотрофов и метанотрофов различного таксономического и филогенетического положения (*Methylobacterium*, *Methylovorus*, *Aminobacter*, *Methylopila*, *Methyloarcula*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Blastobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus*, *Methylocystis*) в геномах показано наличие участков, гомологичных последовательностям генов биосинтеза и секреции цитокининов (Шепеляковская с соавт., 1999). Анализ генома *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T указывает на то, что штамм CBMB20^T имеет два гена *miaA* (MOC_5190 и MOC_5911), кодирующих изопентенил-аденинтрансферазы (Kwak et al., 2014). Кроме того, методами иммуноаффинной хроматографии, ВЭЖХ и радиоиммуноферментным анализом культуральной жидкости бесцветной облигатной метилотрофной бактерии *Methylovorus mays* и РОФМ, выделенных с растений сои, кукурузы, ячменя и арабидопсиса, выявлено наличие зеатина и зеатинрибозида (от 50 до 400 нг/г сухих клеток), а методом ПЦР у факультативного метилотрофа *M. extorquens* обнаружен ген фермента изопентенилтрансферазы, ответственного за первый этап биосинтеза цитокининов (Long et al., 1996; Иванова с соавт., 2000; Троценко с соавт., 2001). Следовательно, некоторые метилотрофные бактерии неспецифически образуют цитокинины путем гидролиза тРНК до изопентенилированного аденина (зеатина), что подтверждено в опытах с получением мутанта *M. extorquens*, у которого делеция гена *miaA*, кодирующего изопентенил-тРНК-синтетазу, привела к полной потере способности синтезировать цитокинины (Koenig et al., 2002).

3.2. Витамин В₁₂

Кроме фитогормонов, многие метиловобактерии способны синтезировать другие биоактивные соединения, в частности, витамины. Известно, что РОФМ синтезируют и накапливают в клетках витамин В₁₂, особенно при росте на среде с метанолом, а также оказывают стимулирующий эффект на рост картофеля, табака и мохообразных (Троценко с соавт., 2001). Стимуляция метанолом образования корриноидов (комплексные соединения трехвалентного кобальта, важнейшим представителем которых является цианкобаламин) вероятно обусловлена активацией кластера ферментов биосинтеза корринового кольца, т.е.

прямым или опосредованным влиянием метанола на экспрессию соответствующих *cob*-генов, а также связью кобаламина с ферментами, катализирующими ключевые реакции C₁-метаболизма.

В геноме *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T имеются кластеры генов *cobPOQD* (MOC_1844 - MOC_1846, MOC_1850), *cobF* (MOC_1916), *cobTS* (MOC_2383 и MOC_2384), *cobWNGHIJKLEMB* (MOC_3494 - MOC_3504), которые участвуют в биосинтезе витамина B₁₂. Ген *icuA*, который кодирует внешний мембранный белок поглощения кобальта, также присутствует в хромосоме (MOC_4703), тогда как *icuB*, кодирующий периплазматический связывающий кобальт белок, не обнаружен (Kwak et al., 2014).

Установлено, что, метиловобактерии родов *Methylobacterium*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Hansshlegelia*, *Paracoccus* синтезировали витамин B₁₂ (6–800 нг/г сырой биомассы). Наиболее высокое содержание кобаламина обнаружено у представителей рода *Methylobacterium* – *M. extorquens* G10 и *M. mesophilicum* (590 и 800 мкг/г сырой биомассы, соответственно) (Иванова с соавт., 2006). Показано, что выход витамина B₁₂ существенно выше при использовании C₁-, нежели C_n-субстратов. Так, при росте на средах с метанолом или дихлорметаном *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 образует 10 мкг B₁₂/г сухой биомассы, а на средах с этанолом и сукцинатом – на 30 % меньше (Данилова с соавт., 2004).

До настоящего времени не доказана необходимость витамина B₁₂ для жизнедеятельности растений, хотя известно, что он необходим всем организмам для реакций изомеризации и трансметилирования.

3.3. Фиксация атмосферного азота

Биологическая азотфиксация – это процесс, осуществляемый исключительно diaзотрофными прокариотами, при котором молекулярный азот восстанавливается в биологически доступный аммоний (Martinez-Romero et al., 2006). В природе пул аммония может также пополняться из абиогенных источников (грозы, вулканы), однако, вклад diaзотрофов намного превышает поступление NH₄⁺ из других источников.

Известно более 100 родов прокариот, способных фиксировать атмосферный азот – это представители всех классов *Proteobacteria*, архей, а также многих других филумов (Zehr et al., 2003). С использованием системы вырожденных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации *nifHD* генов были проанализированы коллекционные штаммы метиловобактерий, принадлежащие к 15 видам и реализующие различные пути C₁-ассимиляции. Специфические ПЦР-продукты были обнаружены у *Beijerinckia* и *Xanthobacter*, но не найдены у представителей вида *M. extorquens*, а также *M. populi* BJ001^T, *M. radiotolerans* JCM 2831^T, *Methylovorus* sp. SIP3-4, *Methylothena mobilis* JLW8^T и *Methylobacillus flagellatus* KT^T (Федоров с соавт., 2008). Анализ геномов выявил присутствие гена *nifH* у клубеньковых симбионтов из рода *Methylobacterium* -

M. nodulans ORS 2060^T и *Methylobacterium* sp. 4-46 и позволил сделать вывод, что эти бактерии взаимодействуют с растениями по “классическому” для ризобий типу (Renier et al., 2008). Данный механизм установлен в результате идентификации генного кластера *nodDABCUIJHQ*, кодирующего ферменты биосинтеза факторов нодуляции, и определения структуры этих соединений. Однако филогенетически *nod*-гены *M. nodulans* ORS 2060^T проявляют большее сходство с последовательностями соответствующих генов *Burkholderia tuberum* STM678^T, чем с генами ризобий (Renier et al., 2008). Отсутствие *nodA*-гена у несимбиотических видов рода *Methylobacterium*, а также значительное сходство белков NodA у *M. nodulans* и *Bradyrhizobium* позволяют предположить, что *M. nodulans* приобрел способность к клубенькообразованию в результате латерального переноса генов.

3.4. Влияние метиловых бактерий на содержание этилена в растениях

Одним из возможных механизмов влияния бактерий на рост и развитие растений является способность снижать уровень этилена в растениях за счет активности фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат (АЦК) дезаминазы (КФ 3.5.99.7). Этилен играет важную роль в развитии корневой системы, нодуляции, старении растений, опадении листьев и созревании плодов, а также в передаче стрессового сигнала (Arshad et al., 2002). Бактерии утилизируют АЦК при помощи АЦК-дезаминазы, катализирующей гидролиз АЦК до α-кетобутирата и ионов аммония (Honma, Shiromura, 1978). Ген АЦК-дезаминазы (*acdS*) и активность фермента обнаружены у многих бактерий различного таксономического положения, ассоциированных с растениями (Glick et al., 2007). До недавнего времени считали, что АЦК-дезаминазы распространены только среди микроорганизмов. Однако показано, что растения также имеют этот фермент (McDonnell et al., 2009).

Гены АЦК-дезаминаз обнаружены у *Methylobacterium radiotolerans*, *M. oryzae* CBMB20^T, *M. nodulans* ORS 2060^T (ген *accD* MOC_1898), *Methylobacterium* sp. 4-46, а также *Methylobium petroleiphilum* (Федоров с соавт., 2011; Kwak et al., 2014). Гетерологичной экспрессией генов *acdS* из *M. radiotolerans* JCM 2831^T и *M. nodulans* ORS 2060^T в клетках *E. coli* с последующей очисткой металлхелатной хроматографией были получены электрофоретически гомогенные препараты рекомбинантных белков AcdS. Определены кинетические характеристики, оптимумы активности и гомотетрамерная структура данных ферментов. Установлено, что гены *acdS* *M. radiotolerans* JCM2831^T и *M. nodulans* ORS 2060^T действительно кодируют АЦК-дезаминазу, которая использует АЦК в качестве единственного субстрата (Fedorov et al., 2013).

3.5. Сидерофоры

Многие виды бактерий и грибов способны синтезировать сидерофоры – низкомолекулярные метаболиты-хелаторы (молекулярная масса 200-2000 Да), специфически

связывающие ионы Fe(III) и ионы таких металлов, как Zn, Ni, Cu, Mn, Co, Mo (Schalk et al., 2011). Железо является одним из важнейших микроэлементов, т.к. принимает участие в транспорте электронов, ферментативных реакциях, метаболизме кислорода, синтезе ДНК и РНК микроорганизмов. В окружающей среде железо можно обнаружить в составе различных минералов (в виде сульфидов, оксидов, гидроксидов, оксигидроксидов, комплексных соединений) (Jambor, Dutrizac, 1998), следовательно, его растворимость и биодоступность весьма ограничена, что является причиной для возникновения сложных адаптационных механизмов, обеспечивающих выживание клеток живых организмов, нуждающихся в микроэлементе. В условиях роста микроорганизмов при дефиците в среде доступного им железа происходит индукция биосинтеза сидерофоров, их секреция клетками продуцента и поглощение растворимого комплекса лиганда с железом Fe(III) (ферросидерофора) с участием специфических рецепторных и транспортных систем. В клетках ионы железа Fe(III) освобождаются путем модификации либо деградации сидерофорных молекул, восстанавливаются до Fe(II), а затем включаются в состав коферментов и простетических групп (Ahmed, Holmstrom, 2014; Johnstone, Nolan, 2015).

В зависимости от наличия функциональных групп сидерофоры делят на несколько типов: 1) сидерофоры на основе пептидов, 2) сидерофоры на основе ди- и триаминоалканов, 3) сидерофоры на основе лимонной кислоты, 4) смешанные сидерофоры (Cornelis, Andrews, 2010). Их также делят на типы: гидроксаматные, катехоловые, карбоксилатные. Гидроксаматные сидерофоры содержат остатки орнитина и лизина, к концевым аминок группам которых присоединены различные заместители. В молекулах катехоловых сидерофоров короткие пептиды *N*-ацетилированы 2,3-гидроксibenзоатом (ДГБ), а в карбоксилатных наряду с аминокислотами присутствуют также остатки гидроксикарбоновых кислот (Темиров с соавт., 2003).

Пептидные сидерофоры. В состав пептидных сидерофоров обычно входят как D-, так и L-аминокислоты, выступающие в качестве лигандов. На обоих концах пептидной цепи располагаются циклические молекулы, предотвращающие их деградацию протеолитическими ферментами. К таким молекулам относятся, например, непротеиногенные аминокислоты (гомосерин, орнитин, 2,4-диаминобутановая кислота) (Cornelis, Andrews, 2010). Наиболее известным представителем пептидных сидерофоров являются пиовердин и его производные, продуцируемые различными представителями рода *Pseudomonas* (Rabaey et al., 2005; Cornelis, Andrews, 2010). Пептидные сидерофоры гидроксаматного типа продуцируют как бактерии (экзохелин идентифицирован у штаммов *Mycobacterium*) (рис. 11), так и представители микроскопических грибов. Примерами катехолового типа сидерофоров являются энтеробактин (энтерохелин), синтезируемый представителями энтеробактерий (*Salmonella*, *E. coli*);

коринебактин или бациллибактин, итеевая кислота (*Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*); хризобактин (*Erwinia*, *Serratia marcescens*) (Winkelmann et al., 2007; Cornelis, Andrews, 2010).

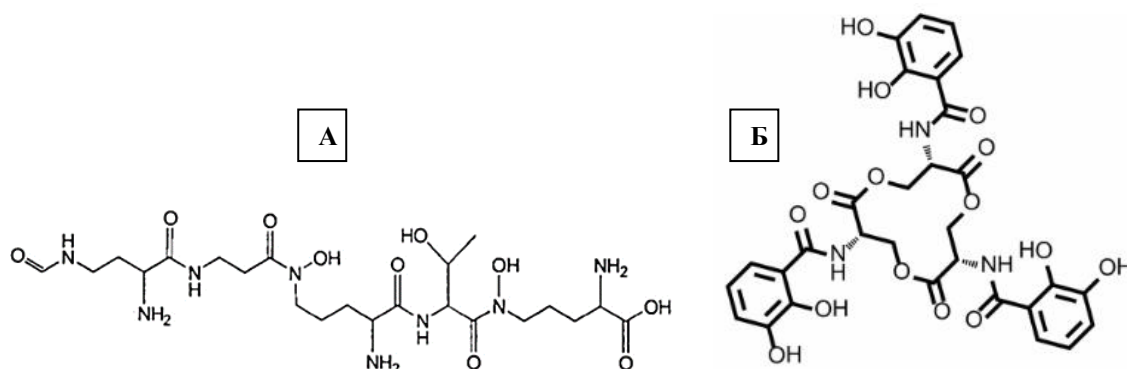


Рис. 11. Химические структуры пептидных сидерофоров гидроксаматового (экзохелин) (А), катехолового (энтеробактин) (Б) типов.

Сидерофоры на основе ди- и триамино-алканов. Сидерофоры на основе ди- и триамино-алканов, также как и пептидные, делятся на два типа. Аминокислотой сидерофоров катехолового типа, как например, протохелина, азотохелина (бис-ДГБ-лизин) (рис. 12) и аминокхелина (моно-ДГБ кадаверин), продуцируемые бактериями *Azotobacter*, является L-лизин, связанный с ДГБ. В случае связывания ДГБ с серином или треонином, происходит циклизация в ходе взаимодействия гидроксильной группы с карбонильной, ведущая к формированию оксазолинового кольца. К гидроксаматному типу относятся сидерофоры путребактин (*Shewanella putrefaciens*), алкалигин (*Alcaligenes denitrificans*) (Cornelis, Andrews, 2010).

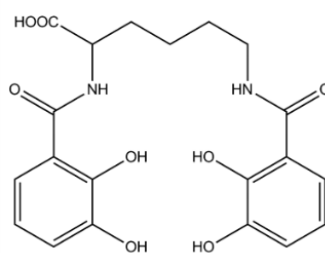


Рис. 12. Химическая структура сидерофора на основе ди- и триамино-алканов – азотохелина.

Сидерофоры на основе лимонной кислоты. Сидерофоры на основе лимонной кислоты включают в себя соединения, в которых скелетом молекулы является лимонная кислота, которая через карбоксильную группу связана, например, с 1,3-диаминопропаном или аминогруппой лизина (артробактин, аэробактин). Если несущей конструкцией сидерофора является 2-оксоглутаровая кислота, тогда ее карбоксильная группа соединяются с

аминогруппами оксопролиновых структур (например, ахромобактин) (рис. 13) (Cornelis, Andrews, 2010).

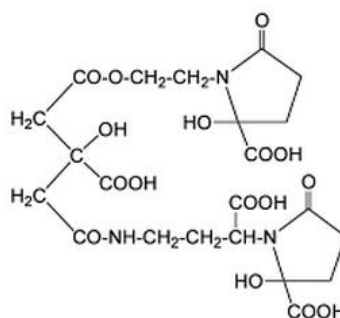


Рис. 13. Химическая структура сидерофора на основе лимонной кислоты – ахромобактина.

Смешанные сидерофоры. В группу смешанных сидерофоров отнесены соединения, например, образуемые в результате конденсации продуктов салициловой кислоты с цистеином, ведущей к образованию триазинового кольца. Типичным представителем данных сидерофоров является пиохелин, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* (рис. 14) (Cornelis, Andrews, 2010).

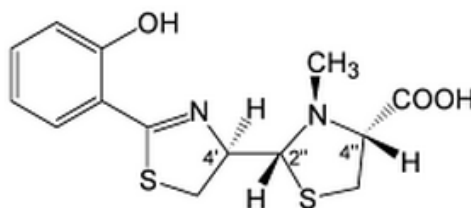


Рис. 14. Химическая структура смешанного типа сидерофоров – пиохелина.

Известно также, что сидерофоры, продуцируемые *Pseudomonas aeruginosa* (пиовердин и пиохелин), способны к хелатированию 16 различных металлов (Braud et al., 2009). Невысокие концентрации молибдена в среде (до 100 мМ) способствуют увеличению продукции сидерофора катехолового типа азохелина штаммом *Azotobacter vinelandii*, но при более высоких концентрациях продукция полностью подавляется (Schalk et al., 2011). Многие бактерии и микроскопические грибы продуцируют более чем один тип сидерофоров и обладают более чем одной системой для внутриклеточного транспорта различного типа сидерофоров (Neilands, 1995). Некоторые штаммы бактерий, неспособные к другим механизмам биологической борьбы, синтезируют сидерофоры и могут применять их в качестве агентов биоконтроля (Темиров с соавт., 2003). Такие бактерии подавляют рост фитопатогенов, синтезируя низкомолекулярные сидерофоры, которые связывают наибольшее количество доступного железа. Сидерофоры некоторых псевдомонад также проявляют антибиотическую активность в

отношении других видов бактерий, обусловленных, по-видимому, подавлением размножения их клеток, лишенных железа (Максимова с соавт., 1994).

Способность к образованию сидерофоров обнаружена у 37 розовоокрашенных метилотрофных штаммов-эндофитов, идентифицированных как представители рода *Methylobacterium*: *M. mesophilicum*, *M. extorquens*, *M. zatmanii*, *M. radiotolerans*, *M. fujisawaense*, однако структура этих соединений не определена (Lacava et al., 2008). Известно, также, что облигатный метилотроф *Methylobacillus mucogenes* M75 является природным продуцентом 2,3-диоксибензоата, выполняющего функцию сидерофора. Синтез этого соединения контролируется Fe^{2+} -ионами и производными хоризмата (*n*-аминобензоатом, *n*-оксибензоатом, антранилатом) (Максимова, 2006).

3.6. Растворение минеральных фосфатов

Фосфор является одним из основных макроэлементов, необходимых для роста и развития живых организмов. Минеральные фосфаты представлены в почве в виде труднорастворимых минералов, таких как апатит, гидроксиапатит, оксиапатит, ди- и трикальцийфосфаты, их содержание варьирует от 400 до 1200 мг/кг почвы. Но концентрация доступного для живых организмов фосфора в почве низкая, т.к. неорганические фосфаты представлены, главным образом, в виде нерастворимых минеральных комплексов, которые появляются после применения химических удобрений. Культурные растения ассимилируют только 10-25% от вносимого с минеральными удобрениями фосфора. Прямая микробная мобилизация фосфатов может служить основой для использования в сельском хозяйстве в виде биофосфорных удобрений (Goldstein, 1986; Дунайцев, 2010). Микроорганизмы, растворяющие фосфаты, способствуют росту и развитию растений, следовательно, улучшают фосфорное питание для себя и растений, т.к. фосфор является лимитирующим макроэлементом для роста и развития живых организмов (Goldstein, 1986). Центральную роль в природном цикле фосфора играют именно микроорганизмы, при этом основным механизмом растворения минеральных фосфатов является действие вырабатываемых ими ряда органических кислот (лимонной, масляной, молочной, янтарной, яблочной, глюконовой, уксусной, гликолевой, фумаровой, α -кетоглутаровой и других). Известно также, что некоторые ризосферные микроорганизмы способны мобилизовать труднорастворимые органические фосфаты вследствие функционирования трех различных ферментов (Lugtenberg, Kamilova, 2009):

1. неспецифическая кислая фосфатаза, которая высвобождает фосфаты из эфира фосфорной кислоты или фосфорного ангидрида;

2. фитаза, которая выделяет фосфаты из фитиновой кислоты, фитиновая кислота также называется мио-инозит-гексакисфосфатом и является основной формой хранения фосфатов в семенах и пыльце;

3. С-Р лиаза или фосфонатаза, которая высвобождает фосфаты из органофосфонатов (Rodriguez et al., 2006).

Фосфатсолубилизирующие бактерии представлены как аэробными, так и анаэробными штаммами, при этом наиболее известными являются представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* и *Erwinia* (Sperberg et al., 1958; Khan et al., 2007). Некоторые представители РОФМ (*Methylobacterium komagatae* и *Methylobacterium gregans*) образовывали прозрачный ореол на агаризованной среде с трикальцийфосфатом (ТКФ) в качестве единственного источника фосфора, что свидетельствовало о растворении ТКФ. Концентрация растворенного фосфора достигала 415 мг/л в жидкой среде NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate growth medium), при этом pH снижался до 3,4, предположительно за счет действия кислых и щелочных фосфатаз (Jayashree et al., 2011). *Methylobacterium oryzae* CBMB20^T также образует прозрачный ореол на агаризованной среде с фитиновой кислотой в качестве единственного источника фосфора. Анализ генома штамма CBMB20^T выявил ген, кодирующий кислую фосфатазу (МОС_4804), два гена, кодирующие фитазу (МОС_1114 и МОС_5789), и *phn*-оперон, кодирующий С-Р лиазную систему (МОС_4396 - МОС_4408). Таким образом, метиловобактерии рода *Methylobacterium* являются группой бактерий, которая повышает эффективность использования фосфора в почве путем растворения минеральных фосфатов. Однако интересным остается выявление данной способности у метилотрофов иного таксономического положения нежели представители рода *Methylobacterium*.

3.7. Антиоксидантная защита растений

Окислительный стресс в растениях возникает в результате действия неблагоприятных факторов внешней среды – засухи, почвенного засоления, влияния низких и высоких температур, ультрафиолетового излучения, недостатка элементов минерального питания, патогенов различной природы, загрязнения радиоактивными веществами, различными ксенобиотиками (пестициды, детергенты, полиароматические углеводороды, тяжелые металлы) – и вызывает образование активных форм кислорода (АФК). АФК являются продуктами нормального метаболизма растений, т.к. в обычных условиях антиоксидантные системы поддерживают внутриклеточную концентрацию АФК на низком уровне. Нарушение баланса между скоростью продукции АФК и скоростью их детоксикации приводит к окислительному стрессу. АФК обладают высокой реакционной способностью и способны наносить вред

структурам клетки и физиолого-биохимическим процессам, протекающим в ней (Шевякова с соавт., 2009). К числу АФК относят производные кислорода радикальной природы (супероксид-радикал (анион-радикал) $O_2^{\cdot-}$, гидроперекисный радикал $HO_2^{\cdot}$, гидроксил-радикал $HO^{\cdot}$), а также его реактивные производные (пероксид водорода H_2O_2 , синглетный кислород 1O_2 и пероксинитрит) (Fuerst et al., 1985). Они вызывают повреждения белков, что проявляется в окислении SH-групп, FeS-центров ферментов, фрагментации пептидных цепей, повышении чувствительности белков к действию протеаз (Scandalios, 2002). Реактивные производные кислорода способны непосредственно взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами, вызывая повреждение азотистых оснований, дезоксирибозы и рибозы и появление новых ковалентных связей (Махдавиан с соавт., 2008). Модификация оснований становится причиной разрывов водородных связей между цепями ДНК и повреждения хромосом. АФК способны инициировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) клеточных мембран, в результате чего происходит повреждение этих структур, связанное с нарушением функций мембранных белков.

Инактивация АФК у растений обеспечивается многоступенчатой системой антиоксидантной защиты, в которой участвуют такие антиоксидантные ферменты, как супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1), каталаза (КФ 1.11.1.6) и пероксидаза (КФ 1.11.1.7), а также низкомолекулярные метаболиты-антиоксиданты (пролин, каротиноиды, аскорбиновая кислота, и др.) (Mittler, 2002). СОД катализирует реакцию восстановления супероксидного анион-радикала до пероксида водорода. Важным свойством пероксида водорода является способность контролировать активность ферментов, участвующих в передаче сигналов в клетке. H_2O_2 является сигнальной молекулой для дальнейшей активации ферментов: каталазы, которая эффективно работает при высоких концентрациях H_2O_2 , и пероксидазы – при невысоком уровне H_2O_2 . Малоновый диальдегид (МДА), конечный продукт ПОЛ, образующийся в ответ на действие стрессового фактора, служит маркером уровня окислительного стресса в растительной клетке, а также является медиатором синтеза низкомолекулярных метаболитов-антиоксидантов, снижающих повреждающее действие АФК и H_2O_2 .

В целом, растения имеют механизмы для защиты от окислительного повреждения с участием антиоксидантных молекул и ферментов, следовательно, растения с высокой концентрацией антиоксидантов обладают большей устойчивостью к окислительному повреждению (Jiang, Zhang, 2002; Yamane et al., 2004). Показано, что колонизация семян бактериями, стимулирующими рост растений, помогает растениям смягчать стресс за счет усиления активности антиоксидантов (Khan et al., 2009; Gill, Tuteja, 2010). Известен антистрессовый эффект *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *P. monteilii*, *Cronobacter dublinensis*, *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*,

Burkholderia ambifaria при воздействии на растения различных абиотических факторов (засуха, засоление, водный дефицит, действие тяжелых металлов) (Rakshapal et al., 2013; Qudsaia et al., 2013; Jay et al., 2013; Islam et al., 2014). Продemonстрирована более быстрая фиторемедиация почв, загрязненных никелем, после инокуляции клеверины и подсолнечника бактериями *Psychrobacter* sp., при этом отмечено повышение активностей антиоксидантных ферментов (каталазы и пероксидазы), хлорофилла и биомассы у колонизированных растений, что свидетельствовало о снижении токсичного действия солей никеля (Ma et al., 2010). В условиях загрязнения почв мышьяком отмечали повышение активностей СОД и каталазы, увеличение длины и сухого веса стеблей, корней и листьев, содержания хлорофилла и растворимых сахаров у тополя после инокуляции *Agrobacterium radiobacter*, снижающего токсичность за счет хелатирования ионов мышьяка сидерофорами и стимулирующего индуцированную системную устойчивость растений за счет синтеза ИУК (Wang et al., 2011). Также ранее установлено, что колонизация сахарной свеклы облигатными метиловыми бактериями *Methylovorus mays* в условиях *in vitro* повышала активность ферментов-антиоксидантов, снижала уровень пероксида водорода и ПОЛ, а в целом положительно влияла на систему антиоксидантной защиты при окислительном стрессе (Пиголева с соавт., 2011). Поэтому в настоящее время одним из перспективных направлений по повышению устойчивости растений к действию различных стрессовых факторов является использование экологически чистых технологий, основанных на применении штаммов бактерий, стимулирующих рост растений. Улучшение доступности питательных веществ, ускорение роста растений, детоксикация металлов – все это способствует снижению биотического/абиотического стресса у растений, за счет синтеза ассоциативными бактериями метаболитов, регулирующих важные физиолого-биохимические процессы растений (фитогормоны, сидерофоры, органические кислоты и т. д.).

Таким образом, образование растениями большого количества различных C_1 -соединений и, прежде всего, метанола, является основой постоянной взаимосвязи с ними метиловыми бактериями. Представляет большой интерес изучение биоразнообразия аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями, их способности к синтезу фитогормонов и других биологически активных соединений, а также экспериментальное доказательство их влияния на рост и развитие растений, что создает предпосылки для последующего изучения стратегий и тактик, реализуемых в их взаимодействии с растениями. Расширение биоразнообразия метилотрофных фитосимбионтов и детальная их характеристика позволяет далее провести селекцию наиболее перспективных стимуляторов роста и развития растений. Метилотрофные фитосимбионты имеют перспективы широкого использования в новых биотехнологиях культивирования растений.

4. Материалы и методы

4.1. Бактериальные штаммы и условия культивирования

4.1.1. Бактериальные штаммы

Объектами исследований служили 37 чистых культур метилюобактерий, выделенных из 28 образцов листьев, хвои и корней различных растений в г. Пущино (54°50'00", с. ш. 37°37'00" в. д.) (Московская область), один образец отобран в г. Сиде (36°46'00", с. ш. 31°23'00" в. д.) (Турция) (табл. 3).

Таблица 3. Изоляты, выделенные из образцов растений

Штамм	Источник выделения	
Frag P, w, Y	Земляника лесная (<i>Fragaria vesca</i> L.) (листья)	г. Пущино, Московская область
Ver P, w	Вероника (<i>Veronica officinalis</i> L.) (листья)	-/-
Vic P	Горошек (<i>Vicia sepitum</i> L.) (листья)	-/-
Aeg P	Сныть (<i>Aegopodium podagraria</i> L.) (листья)	-/-
Tar P, w	Одуванчик (<i>Taraxacum officinale</i> Web.) (листья)	-/-
Нур P	Зверобой (<i>Hypericum perforatum</i> L.) (листья)	-/-
Trif P, w, Y	Клевер (<i>Trifolium repens</i> L.) (листья)	-/-
Beta P	Свекла (<i>Beta vulgaris</i> L.) (листья)	-/-
Plan P, w	Подорожник (<i>Plantago lanceolata</i> L.) (листья)	-/-
Vitis P	Дикий виноград (<i>Vitis</i> sp.) (листья)	-/-
Quercus P, Db w	Дуб (<i>Quercus robur</i> L.) (листья)	-/-
Syringa P	Сирень (<i>Syringia vulgaris</i> L.) (листья)	-/-
Thuja P	Туя (<i>Thuja occidentalis</i> L.) (хвоя)	-/-
Populus P	Осина (<i>Populus tremula</i> L.) (листья)	-/-
Betula P, 1g w	Береза (<i>Betula pendula</i> L.) (листья)	-/-
Larix P, w	Лиственница (<i>Larix decidua</i> L.) (хвоя)	-/-
Tilia P	Липа (<i>Tilia cordata</i> L.) (листья)	-/-
Pinus P	Сосна (<i>Pinus sylvestris</i> L.) (хвоя)	-/-
Abies P	Пихта (<i>Abies alba</i> L.) (хвоя)	-/-
Picea P	Голубая ель (<i>Picea pungens</i> L.) (хвоя)	-/-
Sb w	Рябина (<i>Sorbus aucuparia</i> L.) (листья)	-/-
Klen w	Клен (<i>Acer</i> sp.) (листья)	-/-
Willow w	Ива (<i>Salix fragilis</i> L.) (листья)	-/-
Osot	Осот полевой (<i>Sonchus arvensis</i> L.) (корни)	-/-
Lp-1	Люпин (<i>Lupinus polyphyllus</i> L.) (клубеньки)	-/-
OV	Осока (<i>Carex</i> sp.) (корни)	-/-
Rosa Y	Шиповник (<i>Rosa cinnamomea</i> L.) (листья)	-/-
Side1	Бугенвиллея (<i>Bougainvillea</i> sp.) (листья)	г. Сиде, (Турция)

Объектами исследований служили также 10 штаммов метиловых бактерий-фитосимбионтов из лабораторной коллекции (табл. 4).

Таблица 4. Аэробные метилотрофные бактерии, используемые в работе

Штамм	Источник выделения
<i>Methylobacterium extorquens</i> G10 и Ps2	ризосфера свеклы (<i>Beta vulgaris</i> L.)
<i>Methylobacillus arboreus</i> Iva ^T (BKM B-2590 ^T)	почки ивы (<i>Salix fragilis</i> L.) (Gogleva et al., 2011)
<i>Methylovorus menthalis</i> MM ^T (BKM B-2663 ^T)	корневище мяты (<i>Mentha arvensis</i> L.) (Доронина с соавт., 2011)
<i>Methylopila musalis</i> MUSA ^T (BKM B-2646 ^T)	плод банана (<i>Musa paradisiaca</i> var. <i>sapientum</i>) (Doronina et al., 2013a)
<i>Methylovorus mays</i> C ^T (BKM B-2221 ^T)	ризосфера и филлосфера кукурузы (<i>Zea mays</i> L.) (Доронина с соавт., 2000)
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS2060 ^T	клубеньки бобового растения <i>Crotalaria podocarpa</i> (Jourand et al., 2005)
<i>Methylopila capsulata</i> Minsk	корни осоки (<i>Carex</i> sp.)
<i>Methylovorus glucosotrophus</i> 34	ризосфера риса (<i>Oryza sativa</i> L.).
<i>Methylophilus flavus</i> Ship ^T (BKM B-2547 ^T)	филлосфера шиповника (<i>Rosa cinnamomea</i> L.) (Gogleva et al., 2010)

В качестве референтных в работе использовали коллекционные штаммы: *Methylopila capsulata* BKM B-1606^T, *Methylopila oligotropha* BKM B-2788^T, *Ancylobacter defluvii* BKM B-2789^T, *Ancylobacter vacuolatus* DSM 1277^T, *Ancylobacter polymorphus* DSM 2457^T, *Ancylobacter aquaticus* DSM 101^T, *Ancylobacter rudongensis* DSM 17131^T, *Ancylobacter dichloromethanicus* BKM B-2484^T, *Starkeya novella* DSM 506^T, *Methylobacillus gramineus* BKM B-2591^T.

4.1.2. Условия культивирования

Состав питательных сред.

Среда "К" (г/л): KH_2PO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – 1 л.

Среда "K1" (г/л): KH_2PO_4 – 2,0; KNO_3 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; L-триптофан – 0,2; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – 1 л.

Среда 5/5 (г/л): бакто-триптон ("Pronadisa", Испания) – 5,0; соевый пептон ("Difco", США) – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; аминокислота («Самсон-Мед», Россия) – 60 мл; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – до 1 л.

Среда R2A (г/л): гидролизат казеина – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; протеозопептон – 0,5; глюкоза – 0,5; растворимый крахмал – 0,5; пируват натрия – 0,3; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05; $H_2O_{дист.}$ – до 1 л.

Среда LB (г/л): триптон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 10,0; $H_2O_{дист.}$ – до 1 л.

pH сред устанавливали раствором 5 М NaOH до 7,3.

Раствор витаминов V10 (г/л): биотин – 0,02; *n*-аминобензойная кислота – 0,30; никотиновая кислота – 0,20; липоевая кислота – 0,05; пантотонат кальция – 0,10; пиридоксина дигидрохлорид – 0,50; фолиевая кислота – 0,05; цианокобаламин (B_{12}) – 0,10; тиамин – 0,20; рибофлавин – 0,10; метанол – 1 л.

Метанол и раствор витаминов в необходимой концентрации вносили в стерильные среды.

Получение накопительных культур. Для получения накопительных культур использовали среду “К”, в которую после стерилизации (1 атм; 30 мин) добавляли метанол (2% об/об) и 50 мкл раствора витаминов V10. Культивирование проводили в колбах объёмом 750 мл, содержащих 200 мл среды и 5 г образца посевного материала (листья, хвоя, корни) на шейкере (180 об/мин) при 28°C в течение 5 дней. После появления роста, 10 мл накопительной культуры переносили в свежие среды с метанолом и повторно инкубировали в течение 3 сут (Доронина и др., 2005).

Выделение чистых культур. После трёх пассажей в течение 2 сут на качалке (180 об/мин) при 28°C суспензию накопительной культуры метиловых бактерий высевали истощающим посевом на агаризованную (“Difco”, США, 2%) среду “К” с метанолом (0,5% об/об). Изолированные колонии метиловых бактерий пересеивали на скошенный агар, переносили в жидкую среду и вновь высевали истощающим посевом на агаризованную среду. Реизолированные колонии метиловых бактерий пересеивали на скошенный агар. Чистоту выделенных культур контролировали оптической и электронной микроскопией, а также по однородности колоний, выросших на агаризованных средах с метанолом или глюкозой/ пептоном (Доронина и др., 2005).

Для определения активностей ферментов, состава фосфолипидов, убихинонов **культивирование бактерий** проводили в колбах объёмом 750 мл, содержащих 200 мл среды “К”. После стерилизации (1 атм, 30 мин.) в среду добавляли метанол (0,5% об/об), раствор витаминов V10 (50 мкл/200 мл) и 20 мл жидкой посевной культуры или засевали смывом стерильной средой с агаризованного косяка. Культуры метиловых бактерий инкубировали на шейкере (140 об/мин) при температуре 28°C до начала стационарной фазы роста (1-3 сут). Все штаммы поддерживали пересевом на агаризованной (“Difco”, США, 2%) среде “К” с метанолом.

Для проведения API тестов, описания колоний, определения чувствительности к антибиотикам, потребления ДХМ, культуры выращивали на агаризованной (“Difco”, США, 2%) среде “К” с метанолом. Для проведения анализа жирных кислот референтные штаммы выращивали на среде одинакового состава в одинаковых условиях; облигатные метилотрофы – на агаризованной минеральной среде с метанолом, факультативные – на богатой среде 5/5, R2A.

4.2. Методы исследования

4.2.1. Микроскопия¹

Оптическая микроскопия. Окрашивание по Граму проводили согласно стандартной методике (Методы общей бактериологии, 1984). Изучение морфологии и подвижности клеток в режиме фазового контраста проводили с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse Ci (“Nikon”, Япония), оснащённого камерой ProgRes SpeedXT core5 (“Jenoptik”, Германия).

Электронная микроскопия. Для получения ультратонких срезов клетки фиксировали в растворе: 1,5%-ный глutarовый альдегид в 0,05 М какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 1 ч при 4°C, трижды отмывали в том же буфере и дополнительно фиксировали в 1% OsO₄ в течение 4 ч при 4°C. После обезвоживания в серии спиртов клетки заключали в эпоксидную смолу Epon – 812. Ультратонкие срезы монтировали на опорные сеточки, затем контрастировали уранилацетатом и свинцом. Для негативного контрастирования препаратов клеток использовали 0,3%-ный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (pH 7,2). Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM 100B (“Jeol”, Япония): препараты ультратонких срезов – при ускоряющем напряжении 80 кВ, негативно окрашенные препараты – при 60 кВ (Reynolds, 1963).

4.2.2. Изучение культуральных и физиолого-биохимических свойств

Определение оптимальных для роста изолятов pH, температуры, концентраций NaCl и метанола. Для определения физиологического оптимума клетки выращивали при pH от 5,0–10,0 с шагом 0,5 единиц в условиях с оптимальной солёностью. Необходимые значения pH устанавливали добавлением 5 N NaOH; рост культур оценивали во время экспоненциального роста – на 1–3 сут. Для определения оптимума температуры клетки выращивали в диапазоне от 4 до 40°C; для определения оптимального содержания NaCl: 0–10% в/об при оптимальном значении pH; содержания метанола 0,1–5,0%. Культуры инкубировали в жидкой среде с метанолом на термостатируемой качалке (140 об/мин). Прирост биомассы оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости при $\lambda=600$ нм (ОП600) через 1, 2 и

¹ Световые и электронные фотографии получены с.н.с., к.б.н. Сузиной Н.Е. (ИБФМ РАН, Пущино).

3 сут для определения оптимума pH и метанола, через 3 сут для определения температурного и NaCl-оптимумов.

Потребность в витаминах анализировали на среде, содержащей тиамин (50 мкг/л), биотин (50 мкг/л), B₁₂ (20 мкг/л) или смесь витаминов (V10) (50 мкг/л). Для контроля использовали среду без витаминов.

Устойчивость к антибиотикам определяли с помощью дисков (“Bioanalyse”, Турция), пропитанных следующими антибиотиками (мкг/диск): линкомицин (10), эритромицин (15), пенициллин (10), оксациллин (5), налидиксовая кислота (30), гентамицин (10), хлорамфеникол (30), канамицин (30), стрептомицин (10), новобиоцин (30), тетрациклин (30) и неомицин (30). Культуру высевали на чашки Петри с агаризованной минеральной средой и сверху помещали диски. Влияние антибиотиков на рост клеток и зоны отсутствия роста оценивали после 3-5 дней инкубации.

Способность изолятов использовать различные органические соединения в качестве источника углерода и энергии определяли в жидкой минеральной среде, в которую вместо метанола вносили 0,3% (в/об) или 0,5% (об/об) испытуемого вещества, инокулировали суспензией культуры, смытой с агаризованной среды, и инкубировали 14 сут на качалке при оптимальной температуре. Кроме того, для определения спектра используемых субстратов исследуемых штаммов использовали также API тесты “20E” и “20NE” (“BioMe’rieux”, Франция), согласно инструкции фирмы-производителя.

Способность изолятов использовать различные источники азота определяли, внося в среду “К” вместо (NH₄)₂SO₄ эквимоллярные по азоту количества тестируемых веществ: KNO₃, серина, валина, аланина, аспарагина, фенилаланина, глицина, цистеина, аргинина, глутамата или мочевины.

Гидролиз крахмала оценивали по реакции с раствором Люголя после выращивания культуры на агаризованной среде “К” с метанолом 0,5% (об/об) и добавлением 0,2% (в/об) растворимого крахмала после 3, 7 и 10 дней инкубации при 29°C.

Гидролиз желатины, активность оксидазы и каталазы определяли известными методами (Методы общей бактериологии, 1984).

Способность штаммов расти на метане тестировали в атмосфере метан/воздух 1:1 (об/об) в 750 мл колбах, содержащих 100 мл среды и закрытых резиновыми пробками.

Способность штаммов расти автотрофно проверяли во флаконах в атмосфере H₂/O₂/CO₂ (7:2:1) (об/об/об).

Потребление дихлорметана (ДХМ) оценивали по изменению цвета агаризованной среды растущей культурой с синего на жёлтый. Для этого высевали культуры на агаризованную (“Difco”, США, 2%) среду “К” с 0,1 г/л бромтиолового синего и инкубировали в эксикаторе в

течение недели с добавлением 430 мкл ДХМ. В качестве положительного контроля использовали деструктор ДХМ – *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4^T (ВКМ В-2191^T).

Для оценки антагонистической активности к фитопатогенным грибам штаммы выращивали в жидкой среде "К" до ОП₆₀₀=1,0. 0,5 мл культуры наносили на чашку Петри с агаризованной средой LB с метанолом (0,5%) на расстоянии 3-3,5 см от центра чашки и инкубировали при 28°C. Через 2 сут в центр чашки Петри на поверхность питательного агара помещали сегмент мицелия фитопатогенных грибных штаммов (*Verticillium albo-atrum*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*). Мицелий грибов предварительно выращивали на сусло-агаре при 28°C в течение 7 сут. Чашки инкубировали при температуре 28°C в течение 7 сут, после чего визуально оценивали наличие зоны подавления роста мицелия. Для идентификации феназинов бактериальные культуры выращивали в течение 72 часов при 28°C в 10 мл среды "К". После осаждения клеток (5 мин, 8000 об/мин) супернатант подкисляли с помощью HCl до pH 2 и экстрагировали равным объемом хлороформа. После центрифугирования отбирали хлороформенную фракцию и выпаривали, осадок растворяли в 20 мкл ацетонитрила. ТСХ проводили на пластинах «Silica gel on polyester» («Sigma Aldrich», США) (3-5 мкл экстракта) в системе растворителей хлороформ: этилацетат: муравьиная кислота (5:4:1) (об/об/об). В качестве стандарта использовали феназин-1-карбоновую кислоту («Sigma Aldrich», США).

Для оценки антагонистической активности к бактериям рода *Bacillus* штамм Lp-1 выращивали на жидкой среде ("К" и LB) до ОП₆₀₀=1,0. Клетки культур *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170 или *B. cereus* ATCC 14579^T смешивали с мягкой агаризованной средой LB (0,7% агара) и наслаивали поверх твердого агара LB. На поверхность мягкого агара наносили 0,5 мл культуры или культуральной жидкости штамма Lp-1 и инкубировали при 28°C в течение 2 сут для обнаружения зоны подавления роста.

4.2.3. Аналитические методы

4.2.3.1. Выделение и анализ изопреноидных хинонов²

Хиноны экстрагировали и очищали методом ТСХ (Collins, 1985) из сухих клеток. Клетки выращивали на среде "К" до середины экспоненциальной фазы роста (10 000g, 20 мин). К 2 г лиофилизированной биомассы добавляли 50 мл смеси хлороформ-метанол 2:1 (об/об) и встряхивали при температуре 12°C в течение 3 ч. Экстракт фильтровали через стекловолокнистый фильтр Whatman GF/A и упаривали досуха под вакуумом. Остаток растворяли в 0,2 мл смеси хлороформ:метанол 2:1 (об/об), наносили на пластинки «Silufol» F254

² Анализ хинонов проведён н.с., к.б.н. Баскуновым Б.П. (ИБФМ РАН, Пущино).

(10×20 см, “Kavalier”, Чехословакия) на старте (отступив по 1 см снизу, слева и справа) в виде полосы шириной ~2 мм, и хроматографировали в системе растворителей гексан-диэтиловый эфир 85:15 (об/об). Убихиноны имеют $R_f \sim 0,4$, менахиноны – $\sim 0,7-0,8$. Отмеченный в ультрафиолете (254 нм) участок хроматографического слоя снимали скальпелем и экстрагировали убихиноны 1 мл хлороформа. Экстракт центрифугировали (12 000 g, 15 мин), супернатант переносили в пробирку и упаривали в токе азота. Анализ хинонов проводили на масс-спектрометре “Finnigan” MX-1310 (Германия) в стандартных условиях прямым вводом пробы при температуре испарения образца 160°C.

4.2.3.2. Определение состава жирных кислот³ проводили, как описано ранее (Dorogina et al., 2012). Пробу биомассы клеток с агаризованной среды (10-15 мг) суспендировали в 0,4 мл 1,2 N HCl в метаноле при 80°C в течение 1 ч (кислый метанолиз). Образовавшиеся при метанолизе метиловые эфиры жирных кислот и другие липидные компоненты экстрагировали гексаном. Гексан упаривали, а сухой остаток силилировали в 20 мкл БСТФА [(триметилсилил)трифторацетамидом] 15 мин при 80°C и разбавляли гексаном до 100 мкл. Для анализа 1 мкл смеси вводили в инжектор системы газового хроматографа-масс-спектрометра AT-5850/5973 Agilent Technologies (США). Квадрупольный масс-спектрометр обладал следующими характеристиками: диапазон регистрируемых масс летучих соединений – 2–950 аем, разрешающая способность – 0,5 аем во всём рабочем диапазоне, чувствительность – 0,01 нг по метилстеарату. Ионизацию проводили электронами при ускоряющем напряжении 70 эВ. Для хроматографического разделения пробы использовали капиллярную колонку из плавленого кварца длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм, неподвижная фаза была представлена HP-5ms с толщиной слоя 0,25 мкм. Хроматографирование проводили в режиме программирования температуры от 140 до 320°C со скоростью 7 град/мин. Температура инжектора и интерфейса составляла 280°C. Обработку данных проводили с помощью штатных программ прибора. Вещества в хроматографических пиках идентифицировали с помощью библиотечных программ с базой данных масс-спектров NIST.

4.2.3.3. Определение состава фосфолипидов

Выделение фосфолипидов. Бактерии в конце логарифмической фазы роста осаждали центрифугированием при 6000g 10 мин. Фосфолипиды экстрагировали из 2 г сырой биомассы, тщательно перемешивая её с 3 мл смеси хлороформ: метанол 1:2 (об/об) на холоду в течение 1 ч. Суспензию центрифугировали при 6000g 10 мин. Процедуру экстракции из биомассы

³ Анализ жирных кислот проведён н.с., к.х.н. Быстровой О. В. (Международный аналитический центр ИОХ РАН, Москва).

повторяли дважды, сокращая время второй экстракции до 15 мин. Супернатанты объединяли, добавляли 2 мл хлороформа и 2 мл воды, перемешивали в течение 15 мин на холоду. Смесь центрифугировали 20 мин при 6000g, при этом она разделялась на три слоя: верхний содержал аминокислоты и сахара; интерфаза – белки, нижний слой – фосфолипиды, изопреноидные компоненты и т.п. Полученный раствор фосфолипидов отбирали одноразовым шприцем с длинной иглой, выпаривали на вакуумном испарителе при 30°C. Остаток суспендировали в 200 мкл хлороформа, суспензию разливали по 50 мкл в пробирки Эппендорфа и хранили плотно закрытыми при -20°C.

Разделение фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии проводили на пластинках Kieselgel 60 F254 (“Merck”, Германия) размерами 10×10 см, предварительно отмытых в системе хлороформ/метанол (65:30) (об/об). Для определения состава фосфолипидов на пластинку на старте (отступив по 1 см снизу, слева и справа) наносили в виде пятна диаметром 2–3 мм такое количество раствора фосфолипидов в хлороформе, которое соответствовало поглощению 0,5 ед. после реакции с молибдатным реагентом (~5–7 мкл), и высушивали при комнатной температуре. Двумерную хроматографию проводили в системе хлороформ/метанол/вода (65:25:4) (об/об/об) – для первого направления и хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода – для второго направления (85:12:15:4) (об/об/об/об).

Обнаружение фосфолипидов. Пластинки после извлечения из хроматографической камеры высушивали на воздухе в течение 30 мин и проявляли, осторожно опрыскивая из стеклянного пульверизатора. Фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и другие липиды со свободными аминогруппами проявляли 0,25%-ным раствором нингидрина в ацетоне. После опрыскивания пластинки 1–2 мин выдерживали в сушильном шкафу при 80–100°C до появления пятен. Розово-фиолетовые пятна соответствовали аминокислотам при окрашивании раствором нингидрина, синие пятна на жёлтом фоне соответствовали общему профилю фосфолипидов при проявлении раствором фосфорномолибденовой кислоты. Пятна идентифицировали по результатам разгонки маркерных фосфолипидов в тех же условиях (Говорухина, Троценко, 1989). Кроме того, для визуализации всех липидов сухие пластинки выдерживали в парах йода (в вытяжном шкафу) 10 мин в камере, содержащей кристаллический йод, а также опрыскивали пластинки 10%-ным спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты.

4.2.3.4. Количественный анализ индольных соединений

Способность изолятов образовывать индолпроизводные определяли в культуральной жидкости, выращивая культуры на среде “К” с метанолом, заменой $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на KNO_3 (1 г/л) и добавлением 0,1% (в/об) L-триптофана, используя реактив Сальковского (Gordon, Weber, 1951),

содержащего 0,05 М $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 61,5% HClO_4 . Калибровочную кривую строили со стандартными растворами индолилуксусной кислоты (10, 20, 25, 30, 40, 50, 60 и 100 мкг/мл).

4.2.3.5. Идентификация гиббереллинов

Выделение и экстракция гиббереллинов. *Methylobacillus arboreus* Iva^T (VKM B-2590^T, CCUG 59684^T, DSM 23628^T) культивировали на модифицированной среде «К» с низким содержанием источника азота – 0,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – и 0,5% (об/об) метанола. Культуру выращивали в колбах Эрленмейера (750 мл) с 200 мл среды в течение суток при 28°C и 180 об/мин до $\text{OD}_{600}=1,7$, $\text{КОЕ} = 1 \times 10^9$. Культуральную жидкость от биомассы отделяли центрифугированием при 10000 г в течение 30 мин при 4°C.

Культуральную жидкость (1 л) лиофильно высушивали, растворяли в 15 мл 30 % метанола и подкисляли 5н HCl до pH 2,5-3,0, затем экстрагировали равным объемом этилацетата в течение 20 мин при 4°C. Этилацетатный экстракт упаривали на вакуумном испарителе RVO-64 (Чехия), сухой осадок растворяли в 100 мкл метанола (“Sigma Aldrich”, США). ТСХ проводили на пластинах TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Kieselgel 60, “Merck”, Германия) в системе растворителей хлороформ/этилацетат/муравьиная кислота (50:40:10) (об/об/об). Пластины опрыскивали серной кислотой в этаноле (10:90) (об/об) и нагревали, чтобы вызвать флюоресценцию детектируемых веществ в ультрафиолетовом свете ($\lambda=254$ нм) (Tien et al., 1979). Гибберелловую кислоту GA_3 ($M_w=346,1$) (“Sigma Aldrich”, США) использовали как стандарт. Сорбент, соответствующий по R_f пятну кислоты GA_3 , с хроматограммы, не обработанной раствором H_2SO_4 , счищали, экстрагировали метанолом, отделяли супернатант от осадка. Полученный супернатант разделяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на колонке Shim-pack XR-ODS (75 мм L. × 3,0 мм I.D., 2,2 мкм) (“Shimadzu”, Япония). Элюцию гиббереллинов осуществляли 30% метанолом, подкисленным 0,01 М H_3PO_4 до pH 3,0 со скоростью потока 0,5 мл/мин на хроматографе Shimadzu LC-20AD (“Shimadzu”, Япония), оснащенным дегазатором Shimadzu DGU-20A3 (“Shimadzu”, Япония) и УФ-детектором Shimadzu SPD-20A при 206 нм. Калибровку проводили по трем стандартным растворам GA_3 – 10, 25 и 50 мкг/мл.

Для установления структуры и концентрации гиббереллинов использовали метод жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ/МС)⁴. Культуральную жидкость (50 мл) подкисляли уксусной кислотой (1%, об/об) до pH 2,5, затем четырежды экстрагировали равным объемом раствора уксусной кислоты в этилацетате (1:99) в течение 30 мин при 4°C. Полученный экстракт высушивали при 36°C на вакуумном испарителе RVO-64 (Чехия), сухой

⁴ ЖХ/МС анализ проведен в ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ им. В.Н. Ореховича, Москва)

осадок растворяли в 100 мкл метанола (“Sigma Aldrich”, США) и использовали для анализа. Гибберелловую кислоту GA₃ идентифицировали на масс-спектрометре с тройным квадруполем Agilent 6490 (“Agilent”, США). Аликвоту образца (2,5 мкл) наносили на колонку Agilent Poroshell C18 (4,6 × 50 мм) (“Agilent”, США), скорость элюции – 0,4 мл/мин при 30 °С, время анализа – 8,5 мин. Мобильная фаза А: 0,1 % уксусная кислота; мобильная фаза В: 0,1 % уксусная кислота в метаноле. Временной градиент смеси элюентов: 0-2,5 мин – 70% А + 30% В; 2,5-3,5 мин – 60% А + 40% В; 3,5-6,0 мин – 100% В; 6,0-8,5 мин – 70% А + 30% В. Родительский ион (m/z) $[M-H]^- = 345,1$, фрагмент-ионы: 239,1 (энергия ионизации 10 В), 221,1 (энергия ионизации 20 В). Обработку данных проводили в режиме MRM (Multiple Reactions Monitoring). Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор GA₃ в метаноле (0,1 мг/мл). Калибровочную кривую строили по четырем точкам: 1, 10, 100 и 200 нг/мл, коэффициент корреляции $r^2 = 0,998$.

Для обработки семян салата сухой экстракт, полученный, как указано в пробоподготовке к ЖХ/МС, растворяли в 100 мкл 5% метанола.

Биотестирование проводили на семенах салата *Lactuca sativa* L. (сорт Московский парниковый). Семена стерилизовали 5% раствором NaClO₄ в течение 3 мин, трижды отмывали стерильной дистиллированной водой, обрабатывали 5%-метанольным экстрактом культуральной жидкости *Mb. arboreus* Iva (2,5 мкл на семя), проращивали на 0,7% водном агаре в темноте при 23°C в течение 3 сут. Семена, обработанные раствором GA₃ в 5% метаноле (3,5 нг/мл), использовали в качестве положительного контроля, отрицательным контролем служили семена, обработанные 5% метанолом. Эксперименты проводили трижды в четырехкратной повторности (25 семян на повтор) (Агафонова с соавт., 2018).

4.2.3.6. Анализ фосфатсольбилизирующей способности

Способность к растворению неорганических фосфатов анализировали двумя способами: 1 – на агаризованной и 2 – жидкой среде “К” с метанолом (0,5%) (об/об) (CH₃OH добавляли в начале и на 3, 6 сутки культивирования) и Са₃(РО₄)₂ (“Panreac”, Испания) в концентрации 5 г/л в качестве единственного источника фосфора. Высев в жидкую среду осуществляли смывом клеток с агаризованных косячков для предотвращения внесения растворимого фосфора. Концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в жидкой среде определяли высевом разведенных бактериальных суспензий (10^N раз) на чашки с минеральной агаризованной средой с метанолом.

Концентрацию растворенного фосфора определяли в культуральной жидкости с помощью реактива “Р”, содержащего растворы 1 и 2.

Раствор 1: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 3%-ный раствор в 2%-м растворе Тритона X-100 (4 мл Тритона X-100, 196 мл деионизованной воды, 6 г $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Раствор 2: малахитовый зеленый – 0,06% раствор в 6 н HCl (100 мл 6 н HCl, 0,06 г малахитового зеленого).

Растворы 1 и 2 смешивали (1:1) и через сутки отфильтровывали. Для определения фосфатов к 2 мл культуральной жидкости добавляли 1 мл реактива “Р”, выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Калибровочную кривую строили со стандартными растворами KH_2PO_4 . Измерения проводили на спектрофотометре “Shimadzu” UV-1700 (Япония) при длине волны 614 нм.

Идентификацию муравьиной кислоты в культуральной жидкости штаммов осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с помощью жидкостного хроматографа LC-20AD (“Shimadzu”, Япония), оснащенного дегазатором Shimadzu DGU-20A3 (Япония). Детекцию муравьиной кислоты проводили с помощью УФ-детектора Shimadzu SPD-20A (Япония) при 210 нм. Аликвоту образца объемом 9 мкл наносили на колонку ReproGel (250 × 8 мм; 5 мкм). Элюцию осуществляли со скоростью 1 мл/мин мобильной фазой, содержащей 9 мМ серную кислоту, при длине волны 210 нм. В качестве стандарта использовали 85% муравьиную кислоту (Агафонова с соавт., 2014).

4.2.3.7. Анализ способности к синтезу сидерофоров

Скрининг штаммов на способность к синтезу сидерофоров (на агаризованной среде) проводили, используя универсальную методику с реактивом хромазуолом S (CAS-реактив) (Schwyn, Neilands, 1987). Для приготовления 100 мл CAS-реактива смешивали раствор 1 с 9 мл раствора 2, затем в эту смесь добавляли раствор 3.

Раствор 1: 0,06 г хром-азурола S (“Sigma Aldrich”, США) в 50 мл деионизованной воды.

Раствор 2: 0,0027 г $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 10 мл 10 мМ HCl.

Раствор 3: 0,073 г гексадецилтриметиламмоний бромид (HDTMA) в 40 мл деионизованной воды. Реактив приобретал насыщенный синий цвет.

Раствор стерилизовали в стеклянной посуде при 0,5 атм в течение 30 мин.

Для приготовления 1 л агаризованной среды (2% агара) 32,24 г PIPES (пиперазин-N, N' - бис-2-этансульфоновая кислота) растворяли в 900 мл среды “К” без железа, pH доводили 5М NaOH до 5,6. После стерилизации (0,5 атм в течение 30 мин) охлаждали до 50°C, добавляли 0,5% метанола, смешивали со 100 мл CAS-реактива, после чего стерильно разливали по чашкам Петри. Исследуемые штаммы высевали на поверхность агара, инкубировали в течение 7 суток при 28°C. Изменение синего цвета агаризованной среды на розовый вокруг колоний штаммов указывало на продукцию сидерофоров.

Определение сидерофоров в культуральной жидкости. Для определения сидерофоров в культуральной жидкости штаммов готовили растворы:

Раствор 1: 2 мМ CAS-раствора (0,121 г хром-азурола S в 100 мл деионизованной воды).

Раствор 2: 1 мМ железосодержащий раствор (1 мМ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 10 мМ HCl).

Раствор 3: 0,2 М раствор 5-сульфосалициловой кислоты в деионизованной воде.

CAS-реактив готовили в следующей последовательности:

- 1) 4,307 г PIPES растворяли в 30 мл воды и доводили pH до 5,6 добавлением 6,25 мл концентрированной HCl ;
- 2) 0,0219 г HDTMA растворяли в 50 мл воды в 100 мл колбе, аккуратно перемешав, чтобы избежать образования пены;
- 3) в раствор HDTMA добавили 7,5 мл CAS-раствора, 1,5 мл железосодержащего раствора, раствор PIPES, 2 мл раствора 5-сульфосалициловой кислоты, после чего доводили весь объем до 100 мл.

Реактив стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин, хранили в темноте и использовали в течение 24 часов. Для определения наличия сидерофоров смешивали бесклеточную культуральную жидкость штаммов, выращенных на среде “К” без источников железа, с CAS-реактивом в соотношении 1:1 и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. Изменение окраски синего цвета комплекса Fe-CAS-HDTMA измеряли спектрофотометрически при длине волны 630 нм.

4.2.3.8. Количественное определение белка

Определение содержания белка проводили методом Брэдфорд (Bradford, 1976), а также модифицированным методом Лоури (Lowry et al., 1951). Концентрацию белка в пробах определяли по калибровочной кривой, для построения которой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) “Sigma”, в концентрации 10–2000 мкг/мл, разведённых из стокового раствора 5 мг/мл.

Для определения количества белка по методу Брэдфорд готовили соответствующий реактив:

Реактив Брэдфорд. Кумасси бриллиантовый голубой G-250 (100 мг) растворяли в 50 мл 95%-го этанола; к раствору добавляли 100 мл 85% ортофосфорной кислоты. Полученный раствор разбавляли до конечного объёма 1 л MQ, давали отстояться осадку ночь при комнатной температуре и затем фильтровали через бумажный фильтр. Конечная концентрация реагентов содержала 0,01% (в/об) кумасси бриллиантового голубого G-250, 4,7% (об/об) этанола, 8,5% (об/об) ортофосфорной кислоты. К 20 мкл белкового раствора добавляли 980 мкл реактива

Брэдфорд, перемешивали и выдерживали 10–15 мин для развития окраски, затем измеряли поглощение при 595 нм.

Для определения количества белка по методу Лоури готовили следующие реактивы:

Реактив Фолина. В 1,5 л колбу помещали 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 г NaMoO_4 , 750 мл H_2O , 50 мл 85% H_3PO_4 и 100 мл $\text{HCl}_{\text{конц}}$. Смесь нагревали с обратным холодильником при умеренном кипении в течение 10 ч. Затем добавляли 150 г Li_2SO_4 , 50 мл H_2O и несколько капель брома. Избыток брома удаляли кипячением без холодильника в течение 15 мин. Раствор охлаждали, фильтровали через бумажный фильтр и доводили до 1 л.

Щёлочно-медный реактив. В 1 л $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ растворяли 500 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 г виннокислого калия, 100 г Na_2CO_3 и 20 г NaOH .

Смешивали 1 мл образца с 1 мл щёлочно-медного реактива и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 4 мл реактива Фолина (разведённого в 15 раз) и выдерживали 5 минут на водяной бане при 55°C. Охлаждали водопроводной водой и измеряли оптическую плотность при 650 нм.

4.2.3.9. Спектрофотометрические измерения

Измерения оптической плотности проводили на регистрирующих спектрофотометрах “Shimadzu” UV–1700 (Япония) и Specol 221 (“Carl Zeiss”, Германия), в кюветах с длиной светового пути 1 см. Прирост биомассы оценивали по изменению оптической плотности культуральной жидкости при $\lambda=600$ нм (ОП_{600}) при 30°C. Оптическую плотность культуральной жидкости пересчитывали на вес сухой биомассы по калибровочной кривой.

4.2.3.10. Протеомный МАЛДИ-анализ⁵ бактериальных клеток проводили согласно описанной методике (Horneffer et al., 2004) с использованием времяпролетного Autoflex speed масс-спектрометра с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия).

Колонии бактерий, выросших на плотных средах (~10 мг сухой биомассы) стерильно снимали с агаризованной среды и переносили в раствор (50 мкл) свежеприготовленного 50%-го ацетонитрила (“Sigma”), содержащего 2,5% трифторуксусной кислоты, перемешивали. Полученную суспензию (1 мкл) смешивали с раствором матрицы (1 мкл), в качестве которой использовали насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной (HCCA) кислоты в 50% растворе ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты, высушивали на мишени (MTP 384 target plate polished steel, “Bruker Daltonik”, Германия) при комнатной температуре.

⁵ МАЛДИ-анализ проведён с.н.с., к.б.н. Лауринавичюсом К.С. (ИБФМ РАН, Пущино).

Спектры регистрировали в линейном режиме с задержанной экстракцией ионов на приборе Autoflex speed (“Brucker Daltoniks”, Германия), с импульсным твердотельным Nd:YAG Smartbeam лазером с частотой генерации импульсов 1000 Гц, $\lambda=355$ нм, времяпролетным анализатором и рефлектроном.

Для калибровки прибора использовали бактериальный калибровочный стандарт “Brucker” (BTS), содержащий типичный профиль пептидов и белков *E. coli* DH5 alpha, а также дополнительные белки (Protein Calibration Standard I) для масс-спектрометрии, с диапазоном покрытия масс ~5000–17500 Да (“Brucker Daltonik”, Германия). Запись спектров проводили в режиме положительных ионов; диапазон регистрируемых масс бактериальных белков составлял 2–20 кДа.

Обработку масс-спектров проводили с помощью программных пакетов flexAnalysis 3.0 (Build 80) и Biotyper 3.0 (Build 25) (“Brucker Daltonik” GmbH, Германия), имплементированных в программное обеспечение прибора.

4.2.4. Биохимические методы

4.2.4.1. Определение активностей ферментов

Для энзимологического анализа путей первичного и центрального метаболизма клетки, выращенные на метаноле, в конце логарифмической фазы роста отделяли от среды центрифугированием (6000 g, 15 мин), отмывали и ресуспендировали в буфере, соответствующем методике определения активности фермента.

Дезинтеграцию клеток проводили на ультразвуковом процессоре Misonix Sonicator S-4000 (“Qsonica”, США) с амплитудой 25 мкм, или на дезинтеграторе “MSE” (Англия), мощностью 150 Вт при 20 кГц (6×30 сек с одномоментным перерывом) в пробирках, погружённых в лед. Неразрушенные клетки отделяли центрифугированием при 14 000g в течение 40 мин. Полученный супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активности ферментов.

Метанолдегидрогеназу (К.Ф. 1.1.1.99) определяли по восстановлению дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) при 600 нм (Anthony, Zatman, 1964). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): трис-HCl буфер, pH 9,0–5,0; NH_4Cl – 20; ДХФИФ – 0,075; феназинметосульфат (ФМС) – 0,5; метанол – 10; KCN – 0,5; экстракт. Реакцию начинали добавлением метанола.

Дегидрогеназы формальдегида (К.Ф. 1.2.1.3) и **формиата** (Н.Ф. 1.2.1.2) определяли по восстановлению ДХФИФ (Johnson, Quayle, 1964). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7,0 – 5,0; ДХФИФ – 0,075; ФМС – 0,5; формальдегид – 10 или формиат – 50; экстракт. Реакцию начинали добавлением субстрата.

НАД⁺-зависимую формальдегиддегидрогеназу (К.Ф. 1.2.1.1) определяли по восстановлению НАД⁺ при 340 нм (Johnson, Quayle, 1964). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7,0 – 50; НАД – 0,25; GSH (либо без него) – 10; формальдегид – 2; экстракт. Реакцию начинали добавлением формальдегида.

НАД⁺-зависимую формиатдегидрогеназу (К.Ф. 1.2.1.2) определяли по восстановлению НАД⁺ при 340 нм (Johnson, Quayle, 1964). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСl буфер, pH 7,5 – 50; НАД – 0,25; формиат – 50; экстракт.

Оксипируватредуктазу (К.Ф. 1.1.1.29) определяли по окислению НАД(Ф)Н (Blackmore, Quayle, 1970). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСl буфер, pH 7,4 – 100; НАД(Ф)Н – 0,5; экстракт. Реакцию начинали добавлением 5 мкмоль оксипирувата натрия. При наличии НАДН-редуктазы, полученный результат корректировали на окисление НАДН экстрактом без оксипирувата.

L-серин-глиоксилатаминотрансферазу (К.Ф. 2.2.6.1) определяли спектрофотометрически, регистрируя глиоксилатзависимое образование оксипирувата из L-серина (Blackmore, Quayle, 1970). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСl буфер, pH 7,5 – 100; пиридоксальфосфат – 0,02; НАДН – 0,5; глиоксилат – 10; экстракт. Реакцию начинали добавлением 10 мкмоль L-серина. При наличии в экстрактах активности глиоксилатредуктазы в полученный результат вносили соответствующую поправку.

Гексулозофосфатсинтазу определяли спектрофотометически (Ferenci et al., 1974) по восстановлению НАДФ⁺ в опосредованной реакции с использованием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы. Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7,0; MgCl₂ – 8; НАДФ⁺ – 0,5; глюкозофосфатизомеразу из мышцы кролика – 1,68 мкмольных единиц; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (“Sigma”) – 0,15 мкмольных единиц; рибозо-5-фосфат; экстракт. Реакцию начинали добавлением 5 мкмоль формальдегида.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (К.Ф. 1.1.1.49) определяли по восстановлению НАДФ или НАД (Kornberg, Norecker, 1955). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7,5 – 150; MgCl₂ – 10; НАД(Ф)⁺ – 1,0; натриевую соль глюкозо-6-фосфата – 10; экстракт. Реакцию начинали добавлением субстрата.

6-фосфоглюконатдегидрогеназу (К.Ф. 1.1.1.44) определяли по восстановлению НАДФ⁺ или НАД (Kornberg, Norecker, 1955). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): Трис-НСl буфер, pH 7,5 – 100; MgCl₂ – 10; НАД(Ф)⁺ – 1,0. Реакцию начинали добавлением 10 мкмоль натриевой соли 6-фосфоглюконата.

Альдолазу фруктозо-1.6-бисфосфата (К.Ф. 4.1.2.13) определяли с сопрягающим ферментом глицерофосфатдегидрогеназой (Van Dijken, Quayle, 1977). Реакционная смесь в 2 мл

содержала (мкмоль): Трис-НCl буфер, pH 7,5 – 100; CoCl₂ – 2; НАДН – 0,5; глицерофосфатдегидрогеназу – 0,36 ед; экстракт. Реакцию начинали добавлением 2 мкмоль фруктозо-1,6-бисфосфата.

Альдолазу 2-кето-3-дезоксиглюконоата определяли с сопрягающим ферментом лактатдегидрогеназой (Wood, 1971). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): имидазольный буфер, pH 8,0 – 50; 6-фосфоглюконат (натриевая соль) – 10; НАДН – 0,5; MgCl₂ – 5; дитиотрейтол – 2; лактатдегидрогеназу из мышцы свиньи (“Sigma”) – 5 ед; экстракт. Реакцию начинали добавлением 6-фосфоглюконата. Контролем служила реакционная смесь без 6-фосфоглюконата.

Рибулозобисфосфаткарбоксилазу (К.Ф. 4.1.1. 39) определяли радиоизотопным методом с использованием NaH¹⁴CO₃. Реакционная смесь в 1 мл содержала (мкмоль): Трис-НCl буфер, pH 7,6 – 100; MgCl₂ – 2,5; GSH – 10; рибулозо-1,5-бисфосфат (натриевая соль) – 0,25; NaH¹⁴CO₃ – 18 (20 мккюри), экстракт. Реакцию проводили при 30°C, отбирали пробы объёмом 0,02 мл с интервалом в 2 мин, наносили их на квадраты стекловолокнистой бумаги Whatman GF/F, фиксировали добавлением 0,05 мл 6 N HCl, высушивали и просчитывали радиоактивность.

α-Кетоглутаратдегидрогеназу (К.Ф. 1.2.4.2) определяли по восстановлению НАД (Carls, Hanson, 1971). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 7,0 – 150; КоА – 0,1; НАД – 1; L-цистеин – 10; MgCl₂ – 5; ТПФ – 0,2; α-кетоглутарат – 10; экстракт. Реакцию начинали добавлением α-кетоглутарата.

Изоцитратлиазу определяли спектрофотометрически – по образованию фенилгидразона глиоксилата при 324 нм (Dixon, Kornberg, 1959). Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): К-фосфатный буфер, pH 6,8 – 150; MgCl₂ – 10; фенилгидразин – 6,5; цистеин-НCl – 4; экстракт. Реакцию начинали добавлением 5 мкмоль изоцитрата калия.

Глутаматдегидрогеназу (К.Ф. 4.1.3.2) определяли в реакционной смеси, содержащей в 2 мл (мкмоль): Трис-НCl буфер, pH 7,5 – 100; NH₄Cl – 80, НАД(Ф)Н – 0,5, экстракт. Реакцию начинали добавлением 10 мкмоль α-кетоглутарата.

Глутаминсинтетазу определяли колориметрически модифицированным методом (Elliot, Kaplan, 1955) в γ-глутаминтрансферазной реакции. Реакционная смесь в 7,52 мл содержала: имидазольный буфер, pH 7,15, MgCl₂ – 0,27, арсенат натрия – 12,5, АДФ – 0,18, гидроксиламсин – 20, экстракт. Реакцию начинали добавлением 20 мкмоль L-глутамин, смесь инкубировали 10 мин при 30°C и добавляли 0,6 мл раствора, содержащего 55 г FeCl₃, 20 г трихлоруксусной кислоты и 21 мл HCl в 1 л воды. Контролем служила смесь без L-глутамин. Образующийся осадок удаляли центрифугированием и измеряли поглощение при 540 нм. 0,63 единицы поглощения соответствовали 1 мкмоль/мл γ-глутамилгидроксамата – продукта реакции.

Глутаматсинтазу (Meers et al., 1970) определяли по окислению НАД(Ф)Н при 340 нм. Реакционная смесь в 2 мл содержала (мкмоль): 1,75 мл Трис-НСl буфера рН 7,6 – 50; НАДН – 0,5 или НАДФН 0,5; α -кетоглутарат – 10. Реакцию начинали добавлением 25 мкмоль глутамина.

Удельную активность ферментов выражали, как число нмоль превращённого субстрата или образованного продукта в мин/мг белка. Для определения удельной активности подбирали такое количество белка, при котором скорость линейно зависела от количества фермента. При расчётах использовали следующие коэффициенты молярной экстинкции ($\text{мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$): НАД(Ф) (при 340 нм) – 6,22; ДХФИФ (при 600 нм) – 21,9; ДТНБ (при 412 нм) – 13,6.

В таблицах представлены средние результаты трёх независимых экспериментов, вариация данных $\pm 10\%$.

4.2.4.2. Биохимические тесты

Наличие активностей β -галактозидазы, аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, а также способность гидролизовать мочевины (уреаза), сбрасывать/окислять глюкозу, маннит, инозит, сорбит, рамнозу, сахарозу, мелибиозу, амигдалин и арабинозу, образование H_2S , восстановление нитратов до нитритов, наличие активностей β -галактозидазы, β -глюкозидазы, способность к ассимиляции малата, цитрата, маннозы, арабинозы, глюкозы, мальтозы проверяли с использованием API тестов “20NE” (“BioMe’rieux”, Франция), согласно инструкции фирмы-производителя.

4.2.5. Радиометрические измерения

Радиометрические измерения проводили на жидкостном сцинтилляционном регистрирующем спектрометре LS6500 Multi-Purpose Scintillating Counter (“Beckman Coulter”, США) в смеси, содержащей 4 г 2,5-дифенилоксазола (ППО) и 0,05 г 1,3-ди 2/5-фенилоксазолил бензола (ПОПОП) в 1 л толуола. Для подсчёта водосодержащих образцов использовали сцинтилляционный коктейль Aquasol-2 (“NEN”, Германия).

4.2.6. Молекулярно-генетические методы

4.3.6.1. Выделение и анализ ДНК. ДНК выделяли и очищали по методу Мармура (Marburg, 1961). Нуклеотидный состав ДНК определяли⁶ методом тепловой денатурации на спектрофотометре “Beckman DU-8B” (США) при скорости нагрева $0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$. В качестве стандарта использовали ДНК *E. coli* K-12 (Owen, Lapage, 1976). **Уровень ДНК-ДНК сходства** изолятов и референтных культур определяли методом ДНК-ДНК реассоциации (De Ley et al.,

⁶ Нуклеотидный состав ДНК и ДНК-ДНК гибридизация проведены к.б.н. Детковой Е.Н. (ИНМИ РАН, Москва).

1970; Доронина и соавт., 1988) в трёх повторностях; стандартное отклонение данных реассоциации ДНК составляло $\pm 3\%$.

Фрагменты генов 16S рРНК амплифицировали, используя универсальные для бактерий праймеры 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492r (5'-AAGGAAGGTGATCCAGCTCGT-3') (Lane, 1991); ген *mxaF* – используя пары праймеров 1003f (5' – GCGGCACCAACTGGGGCTGGT – 3') и 1561r (5' – GGGCAGCATGAAGGGCTCCC – 3') (McDonald, Murrell, 1997), и ген *tauA* – используя пары праймеров f1 (5' – ARKCYTGYGABTAYTGGCG – 3') и r1 (5' – GARAYYGTGCARTGRTARGTC – 3') (Neufeld et al., 2007). ПЦР-амплификацию проводили на ДНК-термоциклере MJ Mini ("BioRad", США) в режиме: 1 цикл – 96°C, 3 мин; 30 циклов – 95°C, 40с; 58°C, 40с; 72°C, 90с; последний цикл – 72°C, 4 мин. Реакционная смесь (30 мкл) содержала: по 200 мкМ каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,5 мкмоль соответствующих праймеров; 1 мкл (10–100 нг) геномной ДНК, 3 % (об/об) диметилсульфоксида (Sigma), 1 ед. *Taq*-ДНК-полимеразы, 10×буфер для *Taq*-ДНК-полимеразы. Ампликоны очищали с помощью ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep ("Zymo Research", США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя, и секвенировали на автоматическом секвенаторе CEQ2000 XL ("Beckman Coulter", США). Обработку и перевод нуклеотидных последовательностей в аминокислотные проводили с использованием программы Gene Runner, версия 3.05 [Hastings Software, Inc.].

4.2.6.2. RAPD-анализ (метод случайной амплификации полиморфной бактериальной ДНК)

RAPD-анализ проводили, используя праймеры OPQ1 (5' –GGGACGATGG– 3'), OPQ6 (5' –GAGCGCCTTG– 3') (Balachandar et al., 2008) и RAPDA (5' – CCTGGCGGCTTG – 3') (Wellner et al., 2013) в режиме: 1 цикл – 95°C, 3 мин; 30 циклов – 95°C, 1 мин; 36°C, 1 мин; 72°C, 90 с; последний цикл – 72°C, 5 мин. Реакционная смесь (15 мкл) содержала: 10 мкл воды MQ, 2,2 мкл ПЦР 10×буфера, 1 мкл (10–100 нг) геномной ДНК, смесь 0,2 мМ дНТФ, 4 мкмоль праймера и 1 Е *Taq*-ДНК-полимеразы.

Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. ПЦР-продукты генов 16S рРНК и *mxaF* выделяли и очищали на легкоплавкой агарозе с использованием набора ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep ("Zymo Research", США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

4.2.6.3. Филогенетический анализ

Предварительный скрининг сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК исследуемых штаммов по базе данных GenBank [NCBI] проводили с помощью пакета программ BLAST [<http://ncbi.nlm.nih.gov>], а также на сервере EzBioCloud [<http://www.ezbiocloud.net/>]. Для более точного определения филогенетического положения

изолятов нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК и аминокислотные последовательности белка MxaF выравнивали с последовательностями референтных штаммов ближайших прокариот вручную с помощью редактора Chromas, версия 2.0. [www.technelysium.com.au] с последующим редактированием с помощью программы CLUSTAL W (Thompson et al., 1997). Филогенетический анализ был выполнен при помощи программы MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Филогенетические деревья (филограммы) нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК строили методом присоединения соседей (“neighbor-joining”) (Saitou, Nei, 1987). Порядок ветвления был подтверждён построением филограмм методами минимальной эволюции (“minimum evolution”), максимального правдоподобия (“maximum-likelihood”), невесового попарно-группового метода с использованием средних значений (UPGMA) и максимальной экономии (MP). Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap-анализа” 1000 альтернативных филограмм, используя соответствующую функцию программы MEGA, версия 5 [http://www.megasoftware.net/].

Плазмидную ДНК⁷ выделяли методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989). Визуализацию плазмидной ДНК проводили методом пульс-электрофореза в агарозных блоках-вставках, которые готовили согласно (Alonso et al., 2005). Пульс-электрофорез проводили по протоколу фирмы – производителя («Bio-Rad», США).

4.3. Культивирование растений и анализ растительного материала

4.3.1. Растительный материал, среды для культивирования растений

В работе использовали семена и проростки растений гороха (*Pisum sativum* L.), фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.), огурца (*Cucumis sativus* L.) и томата (*Solanum lycopersicum* Mill.).

Стерильные растения культивировали на 0,7% водном агаре или на половинной среде Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) без витаминов и дополнительных факторов роста, содержащей:

макроэлементы (г/л): KNO_3 – 1,9; NH_4NO_3 – 1,650; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,44; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,37; KH_2PO_4 – 0,17;

микроэлементы (мг/л): $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 22,3; H_3BO_3 – 6,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6; KI – 0,83; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025;

Fe-хелат (мг/л): $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – 37,2; FeSO_4 – 27,85;

агар – 7 г/л; pH 5,8.

⁷ Детекция плазмидной ДНК проведена н.с., к.б.н. Соколовым С.Л., н.с., к.б.н. Сазоновой О.И., м.н.с. Гафаровым А.Б. (ИБФМ РАН, Пущино).

Среду готовили из концентрированных растворов макроэлементов (20×), микроэлементов (100×), Fe-хелата (200×). Стерилизовали автоклавированием (0,5 атм, 30 мин).

Семена гороха и фасоли предварительно тщательно отмывали в мыльном растворе, промывали проточной водой в течение 20 мин и оставляли замачиваться в стерильной воде на 16-20 часов при комнатной температуре.

Семена гороха и фасоли стерилизовали в течение 30 мин, семена огурца и томата – 10 мин в 5% растворе гипохлорита натрия, трижды отмывали стерильной дистиллированной водой. Затем выдерживали в течение 5 мин (семена гороха и фасоли) или 2 мин (семена огурца и томата) в 5%-м этаноле и снова трижды отмывали стерильной дистиллированной водой.

4.3.2. Культивирование растений в стерильных условиях *in vitro*

Стерильные семена гороха и фасоли, переносили в стеклянные пробирки на агаризованную среду МС и водный 0,75% агар, стерильно наносили на семена по 100 мкл суспензии клеток метиловых бактерий в экспоненциальной фазе роста, плотностью 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. В качестве контроля служили семена, обработанные стерильной средой “К”. Растения культивировали при 23-25°C, 16 ч световом периоде в течение 3 недель.

Для моделирования условий абиотического стресса 3-недельные растения гороха инкубировали в 5 мкМ растворе параквата и для контроля в воде в течение 1 ч в темноте и 20 ч на свету (Агафонова с соавт., 2016).

4.3.3. Культивирование растений в нестерильных условиях (микровегетационный опыт)

Стерильные семена огурца и томата проращивали на 0,7% водном агаре в чашках Петри при 23-25°C. На стерильные семена наносили по 0,1 мл суспензии штаммов, взятой из экспоненциальной фазы роста, плотностью около 10^6 - 10^8 КОЕ/мл. На стадии двух семядольных листьев ростки огурца и томата пересаживали в пластиковые сосуды объемом 1,5 л с питательным грунтом, культивировали при 23-25°C и 16 ч световом периоде в течение 45 сут.

4.3.4. Анализ растительного материала

Для определения активности антиоксидантных ферментов навеску растительного материала (0,5 г) растирали в охлажденной ступке с 5 мл раствора для экстракции, содержащего 50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,6 и 0,1 мМ Na₂-ЭДТА. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 14500 g при 4°C, в полученном супернатанте определяли активности ферментов. Спектрофотометрические измерения проводили, как описано в пункте 4.2.3.10, активность ферментов в супернатанте пересчитывали на мг белка, содержание которого в исследуемом образце определяли, как описано в пункте 4.2.4.1.

Активность каталазы определяли спектрофотометрически по изменению концентрации H_2O_2 при добавлении исследуемого образца (Beers, Sizer, 1952). 0,1 мл супернатанта вносили в смесь свежеприготовленной смеси 13,5 мМ H_2O_2 в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,0), активность реакции детектировали в течение первых 30 сек при длине волны 240 нм. При расчете активности каталазы исходили из значения коэффициента молярной экстинкции перекиси водорода $0,0436 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Активность пероксидазы определяли, как описано ранее (Pine et al., 1984). К смеси 1,5 мл 0,01 М калий-фосфатного буфера (pH 6,0), 0,01 мл 1% *o*-дианизидина, 0,1 мл супернатанта добавляли 0,1 мл 0,3% H_2O_2 . Активность реакции детектировали в течение 3-5 мин при длине волны 460 нм. Расчет активности пероксидазы проводили, используя коэффициент молярной экстинкции $11,3 \cdot 10^{-3} \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по скорости ингибирования восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в системе ксантин-ксантиноксидаза описанным методом (Смирнова, Кондакова, 2004). Реакционная смесь (1 мл) содержала: 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 10,2), 50 мМ Na_2CO_3 , 0,1 мМ Na_2 -ЭДТА, 37,5 мкМ НСТ и 0,1 мМ раствор ксантина в 0,5 М NaOH. После добавления 0,05 единиц на пробу ксантиноксидазы, регистрировали изменение оптической плотности в течение 3 мин при длине волны 560 нм и в дальнейшем использовали эту кинетическую кривую для определения начальной скорости восстановления НСТ без СОД. Затем в эту же кювету добавляли образец, содержащий СОД, и в течение 3 мин регистрировали изменение оптической плотности во времени, связанное с восстановлением НСТ в присутствии СОД. Расчет активности СОД производили, используя коэффициент миллимолярной экстинкции образующегося формаза $3,0 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Содержание эндогенного H_2O_2 определяли, как описано (Velikova et al., 2000). Растительные образцы (0,5 г) гомогенизировали в охлажденной ступке в 5 мл 0,1 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат центрифугировали при 12000g в течение 15 мин. К 0,5 мл супернатанта добавляли 0,5 мл 10мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0) и 1 мл 1М KI. Оптическую плотность супернатанта определяли спектрофотометрически при длине волны 390 нм. Содержание пероксида водорода определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием известных концентраций H_2O_2 , исходя из результатов измерений оптической плотности образцов. Для расчета содержания H_2O_2 (мкмоль/г сырого веса) использовали формулу:

$$C = ((K \cdot V \cdot X) / (m \cdot 880)),$$

где C – содержание H_2O_2 , K – концентрация H_2O_2 (по калибровочной кривой) (нг/мл), V – общий объем экстракта (мл), X – разведение (отношение количества внесенного образца к общему

объему реакционной смеси), m – масса сырой навески (г), 880 – коэффициент перевода нг в мкмоль.

Уровень перекисного окисления липидов оценивали, используя метод Коста (Costa et al., 2002), основанный на образовании окрашенного комплекса между малоновым диальдегидом (МДА) и тиобарбитуровой кислотой при нагревании. Растительные образцы (0,3 г) гомогенизировали в охлажденной ступке в 3 мл 20% ТХУ, центрифугировали 20 мин при 3500g. Смесь, состоящую из 1 мл супернатанта, 1 мл 0,5% тиобарбитуровой кислоты в 20% ТХУ и 100 мкл 4% бутилированного гидрокситолуола (ВНТ), помещали в плотно закрытую пробирку, нагревали в водяной бане до 95°C в течение 30 мин и быстро охлаждали на льду. Осадок отделяли центрифугированием при 10000g в течение 15 мин. Концентрацию МДА определяли при 532 нм, вычитая величину неспецифической экстинкции при 600 нм. Содержание МДА на грамм сырого веса пересчитывали с использованием коэффициента экстинкции $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Содержание пролина определяли по методу Бейтс (Bates et al., 1973). Растительные образцы (0,25 г) гомогенизировали в охлажденной ступке с 5 мл 5% сульфосалициловой кислоты в течение 5 мин, гомогенат отфильтровывали, фильтрат использовали для анализа. Смесь, состоящую из 0,5 мл фильтрата, 0,5 мл свежеприготовленного нингидринового реактива (0,25 г нингидрина, 6 мл $\text{CH}_3\text{COOH}_{\text{конц}}$, 4 мл 6 М H_3PO_4) и 0,5 мл $\text{CH}_3\text{COOH}_{\text{конц}}$, помещали в плотно закрытую пробирку, нагревали на водяной бане до 100°C в течение 1 ч и быстро охлаждали на льду. К охлажденной смеси добавляли 1 мл толуола, интенсивно встряхивали в течение 30 сек, отстаивали 10-15 мин. Оптическую плотность верхней фракции смеси измеряли при длине волны 520 нм против толуола. Калибровочную кривую строили по стандартным растворам пролина (от 0,0125 до 0,15 мг в 2 мл раствора), результаты выражали в мг/г сырой биомассы.

Содержание фотосинтетических пигментов в 96%-ных спиртовых вытяжках листьев определяли по ранее описанному методу (Корнилина, 2012). Расчет концентрации пигментов хлорофилла a , b и каротиноидов проводили по формулам для 96%-ного этанола (Wintermans, De Motts, 1965):

$$Ca \text{ (мг/л)} = 13,70 \cdot D_{665} - 5,76 \cdot D_{649};$$

$$Cb \text{ (мг/л)} = 25,80 \cdot D_{649} - 7,60 \cdot D_{665};$$

$$C(a+b) \text{ (мг/л)} = 6,10 \cdot D_{665} + 20,04 \cdot D_{649};$$

$$\text{Скар (мг/л)} = 4,69 \cdot D_{440,5} - 0,268 C_{a+b}.$$

Содержание пигментов в растительном материале в мг/г сырого веса рассчитывали по формуле:

$$A = C \cdot V / P \cdot 1000,$$

где C – концентрация пигмента в мг/л; V – объем вытяжки пигмента в мл; P – навеска растительного материала в г; A – содержание пигмента в растительном материале в мг на 1 г сырого веса.

Для определения удельной плотности листовой пластинки (УПЛП) из листьев вырезали высечки площадью 1см^2 и высушивали их до постоянного веса при температуре 100°C . УПЛП определяли как отношение сухой массы листьев к их площади по формуле:

$$\text{УПЛП} = (2 \cdot a \cdot b) / (\pi \cdot D \cdot C),$$

где УПЛП – удельная плотность листовой пластинки ($\text{мг}/\text{мм}^2$), a – масса высушенных высечек (мг), b – масса сырых высечек (мг), $\pi=3,14$, D – диаметр высечки (мм), C – сырая масса листа, из которого сделаны высечки (мг).

Статистическая обработка данных. Средние значения и стандартные ошибки по каждому варианту исследований вычисляли из трех независимых экспериментов, каждый из которых состоял из 3 биологических повторностей. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента.

5. Результаты

5.1. Разнообразие культивируемых метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями Южного Подмосковья

На минеральной агаризованной среде с метанолом выявлен обильный рост колоний метилотрофов, высеченных с поверхности отобранных образцов листьев, хвои и корней различных растений. Отмечено доминирование розовоокрашенных и ярко-красных над бесцветными и желтопигментированными колониями. Из образцов листьев земляники лесной (*Fragaria vesca* L.), вероники лекарственной (*Veronica officinalis* L.), горошка (*Vicia sepitum* L.), сныти (*Aegopodium podagraria* L.), одуванчика (*Taraxacum officinale* Web.), зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), клевера (*Trifolium repens* L.), подорожника ланцетолистного (*Plantago lanceolata* L.), дикого винограда (*Vitis* sp.), дуба (*Quercus robur* L.), сирени (*Syringia vulgaris* L.), туй (*Thuja occidentalis* L.), осины (*Populus tremula* L.), березы (*Betula pendula* L.), липы (*Tilia cordata* L.), а также образцов хвои лиственницы (*Larix decidua* L.), хвои пихты (*Abies alba* L.), голубой ели (*Picea pungens* L.), сосны (*Pinus sylvestris* L.) выделены в чистую культуру 20 штаммов розовоокрашенных факультативных метилотрофов (РОФМ) (табл. 5). С листьев земляники, вероники дубравной, одуванчика, клевера, подорожника, рябины, дуба, березы, клена, ивы, корней осота, люпина и осоки выделены бесцветные метилотрофные бактерии. Наряду с этим, только в образцах листьев земляники, клевера и шиповника были обнаружены желтоокрашенные плеоморфные бактерии рода *Xanthobacter*, кокковидные непигментированные бактерии рода *Paracoccus*, облигатные и ограниченно-факультативные метиловобактерии родов *Methylophilus* и *Methylovorus*. Согласно данным световой микроскопии, все представители РОФМ – палочки, содержащие гранулы полигидроксibuтирата (ПГБ). Выделенные нами 20 розовоокрашенных штаммов имели высокий уровень сходства (98,0-100%) с *Methylobacterium extorquens* ATCC 43645^T (рис. 15, табл. 5). Примечательно, что ранее из семян и почек древесных и хвойных пород растений г. Пущино в зимний период также выделялись преимущественно РОФМ, которые также имели высокий уровень ДНК-ДНК гомологии (22-63%) с *Methylobacterium extorquens* ATCC 43645^T (Доронина с соавт., 2004). Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследованных штаммов, представлено на рис. 15.

Таблица 5. Аэробные метилотрофные бактерии, ассоциированные с растениями Южного Подмосковья (г. Пушкино)

Штамм	Уровень сходства по нуклеотидным последовательностям гена 16S рРНК	Ауксины, мкг/мл*
Розовоокрашенные (Pink)		
Frag P	100% <i>Methylobacterium extorquens</i> ATCC 43645 ^T	50,2
Ver P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	10,2
Vic P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	14,3
Aeg P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	19,4
Tar P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	7,9
Hyp P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	5,2
Trif P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	40,1
Beta P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	15,9
Plan P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	8,7
Vitis P	99,3% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	3,8
Quercus P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	6,7
Syringa P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	15,4
Thuja P	99,3% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	4,9
Populus P	98% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	11,3
Betula P	99,1% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	24,5
Larix P	99,6% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	9,9
Tilia P	100% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	5,5
Pinus P	99,2% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	10,0
Abies P	98% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	4,7
Picea P	99,7% <i>M. extorquens</i> ATCC 43645 ^T	6,8
Бесцветные (white)		
Sb w	99,3% <i>Methylopila oligotropha</i> 2395A ^T	3,6
Ig w	100% <i>Mp. oligotropha</i> 2395A ^T	3,1
Db w	97,7% <i>Hansschlegelia plantiphila</i> S1 ^T	4,4
Klen w	98,3% <i>H. plantiphila</i> S1 ^T	4,5
Larix w	99,5% <i>H. plantiphila</i> S1 ^T	
Willow w	100% <i>Methylobacillus arboreus</i> Iva ^T	7,2
Trif w	99% <i>Mb. glycogenes</i> DSM 5685 ^T	7,0
Tar w	98,5% <i>Mb. glycogenes</i> DSM 5685 ^T	7,0
Frag w	100% <i>Paracoccus huijuniae</i> ACCC 05690 ^T	5,8
Ver w	98% <i>P. denitrificans</i> ATCC 17741 ^T	6,0
Plan w	98,1% <i>Methylophilus methylotrophus</i> ATCC 53528 ^T	6,5
Osot	98,8 % <i>Ancylobacter defluvii</i> SK15 ^T	9,5
Lp-1	99,9% <i>Delftia lacustris</i> 332 ^T	7,0
OV	99,6% <i>Mb. gramineus</i> Lap ^T	6,8
Желтопигментированные (Yellow)		
Rosa Y	100% <i>Methylophilus flavus</i> Ship ^T	6,5
Frag Y	100% <i>Xanthobacter autotrophicus</i> ATCC 35674 ^T	7,2
Trif Y	100% <i>X. autotrophicus</i> ATCC 35674 ^T	7,0

* Показаны средние данные трех независимых экспериментов (стандартное отклонение не более $\pm 5\%$)

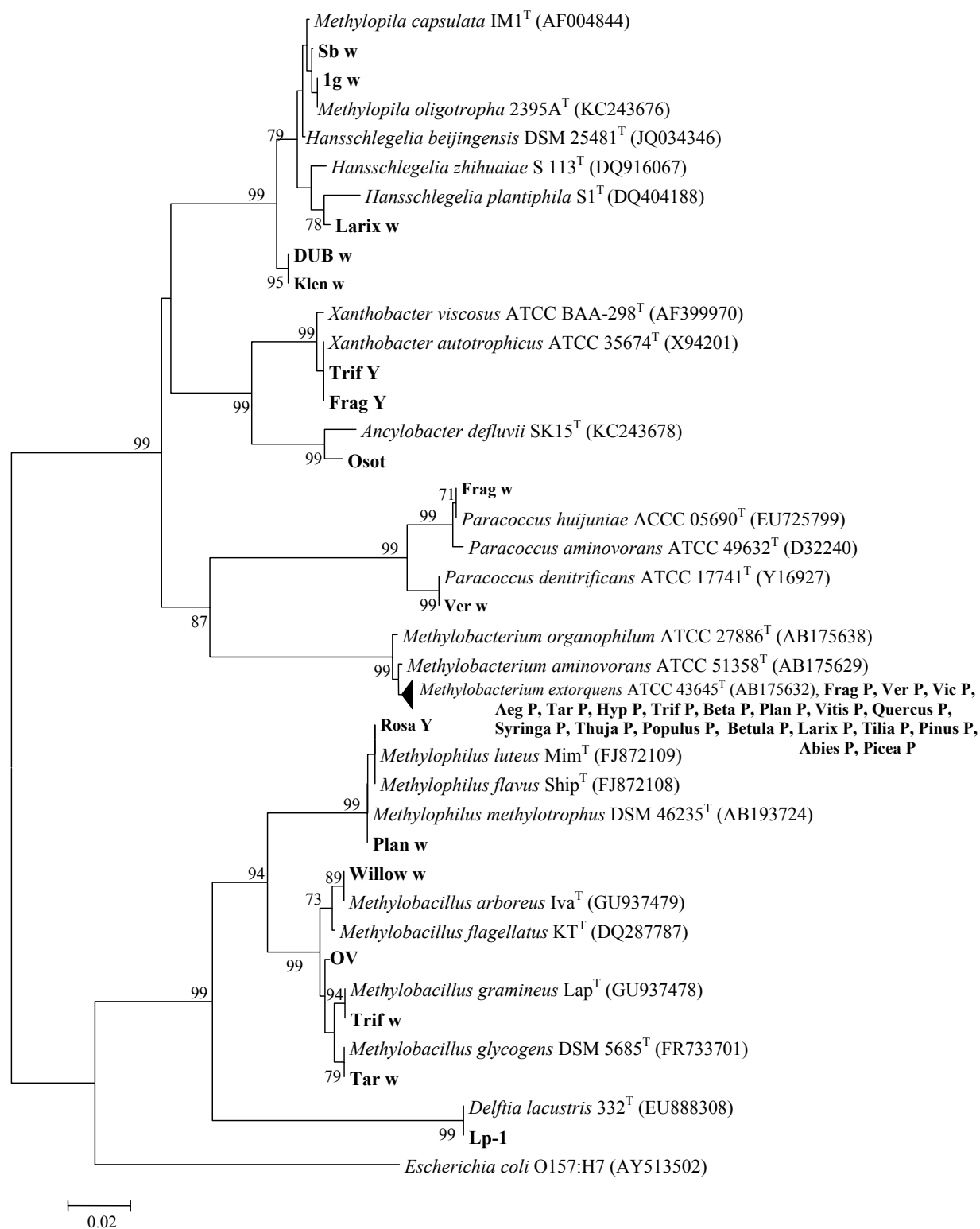


Рис. 15. Филограмма, показывающая положение исследуемых штаммов на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев. Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы.

Желтопигментированный изолят штамм Rosa Y проявлял высокое сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с представителями рода *Methylophilus* (100% с *Mph. flavus* Ship^T и 99,8 % с *Mph. luteus* Mim^T (Gogleva et al., 2010) – первые желтоокрашенные представители данного рода впервые описаны ранее в нашей лаборатории). Несмотря на то, что желтоокрашенные штаммы Frag Y и Trif Y выделены с разных растений, они имели 100% сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с представителем рода *Xanthobacter autotrophicus* ATCC 35674^T.

Бесцветный метилотроф штамм Plan w по данным секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК имел 98,1% сходства с *Mph. methylotrophus* ATCC 53528^T. Штамм Willow w имел наибольшее сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с представителем рода *Methylobacillus* – *Mb. arboreus* Iva^T (100%), штамм OV с *Mb. gramineus* Lap^T (99,6%), другие штаммы – Trif w (99%) и Tar w (98,5%) – с *Mb. glycogenes* DSM 5685^T. Штаммы Db w, Klen w и Larix w наиболее близки по уровню сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с представителем рода *Hansschlegelia* – *Hansschlegelia plantiphila* S₁^T (97,7%, 98,8% и 99,5%, соответственно). Штаммы Sb w и lg w отнесены к известному виду *Methylopila oligotropha* 2395A^T, т.к. имеют с ними 99,3 и 100% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК. Штамм Frag w имеет 100% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с *Paracoccus huijuniae* ACCC 05690^T, тогда как штамм Ver w всего 98% с другим видом этого рода – *P. denitrificans* ATCC 17741^T. Штамм Lp-1 имеет 99,9% сходства с *Delftia lacustris* 332^T, а Osot – 98,8 % с *Ancylobacter defluvii* SK15^T (рис. 15).

Показано, что наиболее распространенными культивируемыми метиловыми бактериями, ассоциированными с 20 видами растений Южного Подмосквья, являются розовоокрашенные представители рода *Methylobacterium*, причем доминирует вид *Methylobacterium extorquens*. Бесцветные и желтопигментированные метилотрофные бактерии, ассоциированные с растениями Южного Подмосквья, отнесены к различным родам: *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Hansschlegelia*, *Methylopila*, *Xanthobacter*, *Ancylobacter*, *Delftia* и *Paracoccus* (Капарулина с соавт., 2017). Представители рода *Methylobacterium* являются наиболее исследованными метиловыми бактериями-фитосимбионтами, т.к. РОФМ являются факультативными метилотрофами, наряду с C₁-соединениями растут на широком спектре полиуглеродных субстратов. При этом облигатные и ограниченно-факультативные метилотрофы могут быть более предпочтительны как стимуляторы роста растений в лабораторных условиях *in vitro*, например, в космических оранжереях. Ряд выделенных нами штаммов (Populus P, Abies P, Db w, Klen w, Tar w, Ver w, Plan w, Osot, OV), вероятно, являются представителями новых видов метилотрофных бактерий. Штаммы Osot, OV и Lp-1 являются объектами дальнейших исследований.

5.2. Характеристика новых изолятов аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями

5.2.1. Морфология

Новые изоляты – штаммы OV, Lp-1 и Osot, а также выделенный ранее штамм Side1, представлены грамотрицательными подвижными палочками, размножающимися бинарным делением. Спор и протек не образуют (рис. 16).

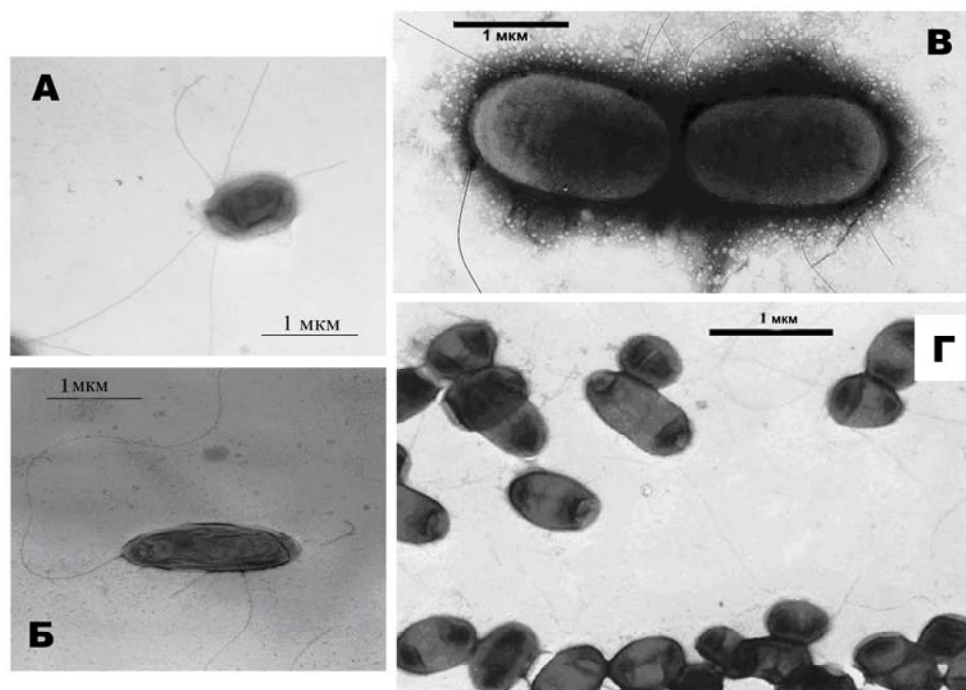


Рис. 16. Морфология клеток штаммов (негативное контрастирование): Side1 (А), OV (Б), Lp-1 (В), Osot (Г). Длина масштабной метки 1 мкм.

На 3 сут на агаризованной среде “К” с 0,5% метанола при оптимальной температуре роста выделенные метиловобактерии образуют круглые колонии, с ровным краем, гладкой поверхностью, выпуклым профилем, однородные, бесцветные, прозрачные (штаммы OV и Lp-1) или белые непрозрачные (штаммы Side1 и Osot). На агаризованной среде с пептоном колонии штаммов Lp-1 и Osot имеют светло-желтую окраску.

5.2.2. Культуральные, физиолого-биохимические и хемотаксономические свойства

Исследуемые бактерии культивировали при различных температурах, значениях pH, концентрациях NaCl и метанола в среде. Показано, что все исследуемые штаммы мезофильны, предпочитают нейтральные или слабо-щелочные условия, негалофильны, однако штамм OV способен выдерживать до 3% NaCl в среде. Оптимально растут в присутствии 0,5 – 1% (об/об) метанола в среде (табл. 6).

Таблица 6. Условия роста исследуемых штаммов

Штамм	Диапазон pH, (оптимум)	Диапазон t, °C (оптимум)	Диапазон NaCl, % (оптимум)	оптимум CH ₃ OH, %
Side1	6,0 – 9,0 (7,0)	20 – 40 (29 – 32)	0,5 – 2,5 (0,5)	0,5
Lp-1	6,0 – 9,0 (7,1 – 7,3)	20 – 40 (24 – 26)	0 – 1,0 (0,05)	1
Osot	6,0 – 9,0 (7,5 – 8,0)	10 – 30 (22 – 29)	0 – 0,5 (0,05)	0,5
OV	6,0 – 9,0 (7,5 – 8,5)	20 – 37 (22 – 29)	0 – 3 (2)	1 – 1,5

Все исследуемые штаммы растут на жидкой среде с метанолом без агрегации клеток, пигмент не образуют. Штамм Side1 растет также на метиламине, триметиламине, фруктозе, этаноле, малате, ацетате, сукцинате, глутамате; штаммы Lp-1 и Osot ассимилируют широкий спектр субстратов (табл. 7). Следовательно, штаммы Side1, Lp-1 и Osot, растущие на ряде полиуглеродных субстратов, являются факультативными метиловыми бактериями, штамм OV, использующий только метанол, является облигатным метилотрофом.

Наряду с аммонийным азотом, все штаммы используют KNO₃. Способностью к нитратредукции обладает штамм Lp-1. Все исследуемые штаммы не образуют аммиак или сероводород на тестовых средах.

Штаммы Lp-1 и Osot способны к автотрофному росту в атмосфере H₂/O₂/CO₂. Растворимый крахмал в присутствии метанола гидролизуют все исследуемые изоляты, но не гидролизуют желатину.

Все штаммы оксидазо- и каталазоположительные. Активности аргининдигидролазы, β -глюкозидазы и β -галактозидазы не обнаружены у штаммов Side1 и OV, но выявлены у штаммов Lp-1 и Osot.

В фосфолипидном составе клеток изолятов Side1, Lp-1 и Osot преобладают фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин. Для штамма OV характерны – фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин.

В жирнокислотном составе клеток штамма Side1 преобладают цис-11-октадеценовая C_{18:1 ω 7c} (76,4%), 11-метил-октадеценовая C_{18:1 ω 7c11Me} (5,3%) и октадекановая C_{18:0} (4,5%) кислоты. Основной убихинон – Q₁₀.

У штамма Lp-1 преобладают гексадекановая C_{16:0} (34,2%), 7-гексадеценовая C_{16:1 ω 9} (14,5%), цис-11-октадеценовая C_{18:1 ω 7c} (17,3%), 11-метилгексадеценовая C_{11Me16:1} (6,6%), циклогептадекановая C_{17:0 cyc} (6,3%) жирные кислоты. Доминирующий убихинон – Q₈.

Доминирующими жирными кислотами у штамма Osot при росте на среде R2A являются 9-цис-октадеценовая C_{18:1 ω 9c} (49,0%), цикло-нонадекановая C_{19:0 cyc} (38,4%), гексадекановая C_{16:0}

(8,4%), а также октадекановая $C_{18:0}$ (2,8%) и 9-эйкозеновая кислоты $C_{20:1\omega 11c}$ (0,9%). Основной убихинон – Q_{10} .

В составе жирных кислот клеток штамма OV преобладают гексадекановая $C_{16:0}$ (45,5%), цис-9-гексадеценная $C_{16:1\omega 7c}$ (40,7%), цикло-гептадекановая $C_{17:0 \text{ cyc}}$ (8,0%), 9-октадеценная $C_{18:1\omega 9}$ (1,9%), тетрадекановая $C_{14:0}$ (1,1%) кислоты. Основной убихинон – Q_8 .

Таблица 7. Использование различных источников углерода исследуемыми штаммами.

Субстрат	Штаммы			
	Side1	Lp-1	Osot	OV
Ацетат	+	+	+	–
Глутамат	+	+	+	+/-
Сукцинат	+	+	+	–
Формиат	–	–	+/-	–
Фумарат	н.о.	+	+	–
Сахароза	–	+	+	–
Ксилоза	–	+	+	–
Лактоза	–	–	+	–
Фруктоза	+	–	+	–
Галактоза	–	+	+	–
Глюкоза	–	+	+	–
Арабиноза	–	+	+	–
Манноза	–	–	+	–
Маннит	+/-	+	+	–
Мальтоза	–	–	–	–
Глюконат	–	+	+	–
Каприновая кислота	–	+	–	–
Адипиновая кислота	–	+	–	–
Малат	+	+	–	–
Цитрат натрия	–	+	–	–
Инозит	–	–	+	–
Сорбит	–	–	+	–
L-рамноза	–	+/-	+	–
D-мелибиоза	–	–	+	–
D-глюконовая кислота	–	+	+	–
Пируват	–	+	+	+/-
α -Кетоглутарат	–	+	–	–
β -аланин	–	+	–	–
Серин	–	+	+/-	–
Ацетамид	–	+	+	–

Продолжение таблицы 7. Использование различных источников углерода исследуемыми штаммами.

Субстрат	Штаммы			
	Side1	Lp-1	Osot	OV
Метиламин	+	+	+	–
Диметиламин	–	–	+	–
Триметиламин	+	–	+	–
Этанол	+	+	–	–
Диметилсульфоксид	н.о.	–	–	–

Примечание: н.о. – не определяли.

5.2.3. Энзимологический анализ

Все исследуемые штаммы имеют активность классической метанолдегидрогеназы, проявляющей активность с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом (ФМС), имеющей оптимум pH 9,0 и зависящей от ионов аммония (табл. 8).

У штаммов Side1 и OV активности дегидрогеназ формальдегида и формиата с ФМС выше по сравнению с НАД-зависимыми формами этих ферментов. У штамма Lp-1 активность НАД-зависимой формы дегидрогеназ формальдегида и формиата выше по сравнению с активностью соответствующих дегидрогеназ с ФМС. У штамма Osot НАД⁺-зависимая формальдегиддегидрогеназа активна только в присутствии восстановленного глутатиона (GSH), также обнаружена активность НАД⁺-зависимой формы дегидрогеназы формиата.

Исследуемые метилотрофы реализуют различные пути C₁-ассимиляции.

Штамм Side1 реализует ицл-негативный вариант серинового пути C₁-метаболизма, о чем свидетельствуют высокие активности ключевых ферментов серинового пути – L-серин-глиоксилатаминотрансферазы и оксипируватредуктазы, отсутствие активностей изоцитратлиазы, а также ключевых ферментов РМФ и РБФ путей – гексулозофосфатсинтазы и рибулозобисфосфаткарбоксилазы, соответственно.

Штаммы Lp-1 и Osot обладают ключевым ферментом рибулозобисфосфатного пути (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой) и не имеют активностей ключевых ферментов серинового и РМФ путей C₁-метаболизма (серинглиоксилатаминотрансферазы и гексулозофосфатсинтазы), следовательно, реализуют рибулозобисфосфатный путь ассимиляции углерода.

Таблица 8. Активности ферментов (нмоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) в экстрактах клеток выращенных на метаноле

Фермент	Кофактор	Штамм			
		Side1	Lp-1	Osot	OV
Метанолдегидрогеназа	ФМС	415	126	49	241
Формальдегиддегидрогеназа	ФМС	45	188	0	61
	НАД ⁺	0	791	0	38
	НАД ⁺ +GSH	4	791	107	н.о.
Формиатдегидрогеназа	ФМС	47	144	0	36
	НАД ⁺	0	163	53	7
Гидроксипироватредуктаза	НАДН	1005	552	267	0
	НАДФН	322	662	214	0
Серин-глиоксилатминотрансфераза	НАДН	422	0	0	0
	НАДФН	115	0	0	0
Изоцитратлиаза		0	220	н.о.	н.о.
Гексулозофосфатсинтаза		0	0	0	55
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	НАД ⁺	3	133	0	633
	НАДФ ⁺	14	464	214	544
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	НАД ⁺	4	192	0	110
	НАДФ ⁺	4	66	107	244
2-Кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконатальдолаза		0	0	0	28
Фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза		13	221	107	0
Рибулозобисфосфаткарбоксилаза		0	120	298	0
Глутаматдегидрогеназа	НАДН	51	441	107	0
	НАДФН	105	129	0	590
Глутаматсинтаза	НАДН	24	27	0	0
	НАДФН	33	111	0	0
Глутаминсинтетаза	АТФ, Mn ²⁺	480	10	0	0

Показаны средние значения результатов трех независимых экспериментов (стандартная ошибка не превышала $\pm 5\%$), н.о. – не определяли

Штамм OV реализует рибулозомонофосфатный путь C₁-метаболизма, о чём свидетельствуют активности ключевого фермента – гексулозофосфатсинтазы, а также дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата. Обнаружена активность 2-кет-3-

дезоксиг-6-фосфоглюконатаальдолазы, следовательно, данный штамм реализует КДФГ-вариант РМФ-пути, что типично для облигатных и ограниченно-факультативных метилотрофов.

Наличие у штаммов Side1 и Lp-1 активностей глутаматдегидрогеназы, глутамат- и глутаминсинтетазы свидетельствует, что штаммы ассимилируют аммиак через глутаматный цикл и восстановительное аминирование α -кетоглутарата. У штаммов Osot и OV, аммонийный азот ассимилируется восстановительным аминированием α -кетоглутарата.

5.2.4. Филогенетический анализ

Штамм Lp-1 имеет высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК с представителями рода *Delftia*: 99,9% с *D. lacustris* 332^T, 99,8% с *D. tsuruhatensis* T7^T, 99,0% с *D. acidovorans* IAM 12409^T и только 94% с недавно описанным видом *D. deserti* YIM Y792^T (рис. 17). Содержание Г+Ц пар в ДНК у штамма Lp-1 составляет 66,9 мол. %. Для рода *Delftia* характерно содержание Г+Ц пар 67 – 69 мол. %, однако у *D. tsuruhatensis* ATCC BAA-554^T эта величина составляет 66,2 мол. %, тогда как у нетипового *Delftia tsuruhatensis* HR4 только 62,7 мол. %. На основании данных секвенирования нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК, а также морфологических и хемотаксономических признаков новый изолят идентифицирован как представитель рода *Delftia* – *Delftia* sp. Lp-1.

Для *Delftia* sp. Lp-1 также определена нуклеотидная последовательность гена *mxaF*, кодирующего большую субъединицу метанолдегидрогеназы. Сравнительный анализ транслированной аминокислотной последовательности гена *mxaF* показал наибольшее сходство *Delftia* sp. Lp-1 с представителями родов порядка *Rhizobiales* класса *Alphaproteobacteria*: 94,0% с *Angulomicrobium tetraedrale* DSM 5895^T, 91,9% – *Starkeya novella* DSM 506^T и 85,5% – *Ancylobacter dichloromethanicum* DM16^T, также реализующими РБФ путь C₁-метаболизма (рис. 18). Проведенный нами анализ геномов других представителей рода *Delftia* – *D. acidovorans* SPH-1 и *D. lacustris* LZ-C выявил наличие гена большой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы (*rbcL*) и отсутствие малой субъединицы, поэтому неизвестно, способны ли эти виды к автотрофии. Кроме того, в геномах вышеуказанных штаммов не найден ген *mxaF*, кодирующий классическую метанолдегидрогеназу.

Поскольку *Delftia* sp. Lp-1 имеет классическую PQQ-зависимую метанолдегидрогеназу (показаны активность фермента и наличие *mxaF* гена), предположили, что данный штамм мог приобрести способность окислять метанол в результате горизонтального переноса генов от других родственных метиловых бактерий.

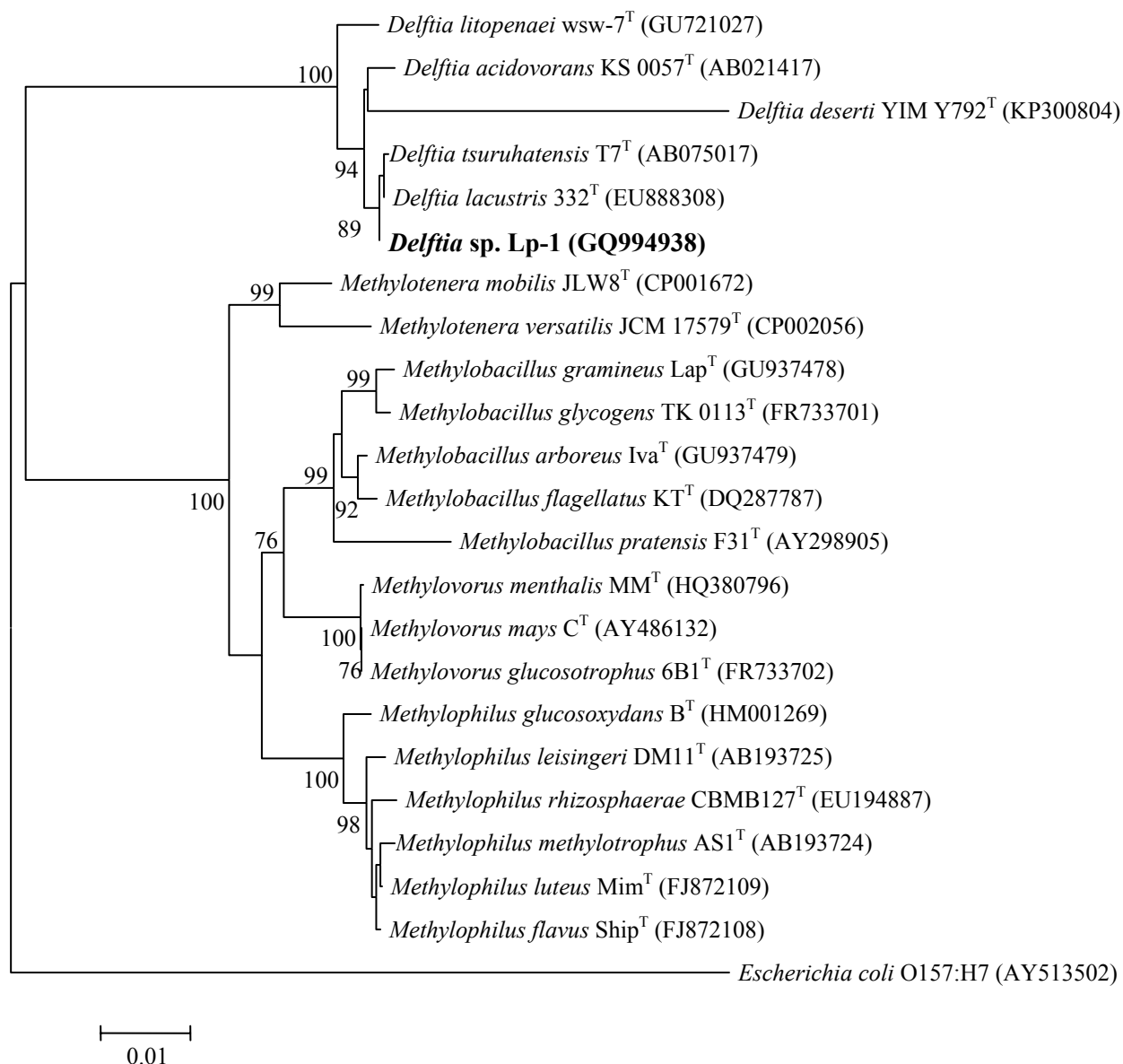


Рис. 17. Филограмма, показывающая положение штамма Lp-1 на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

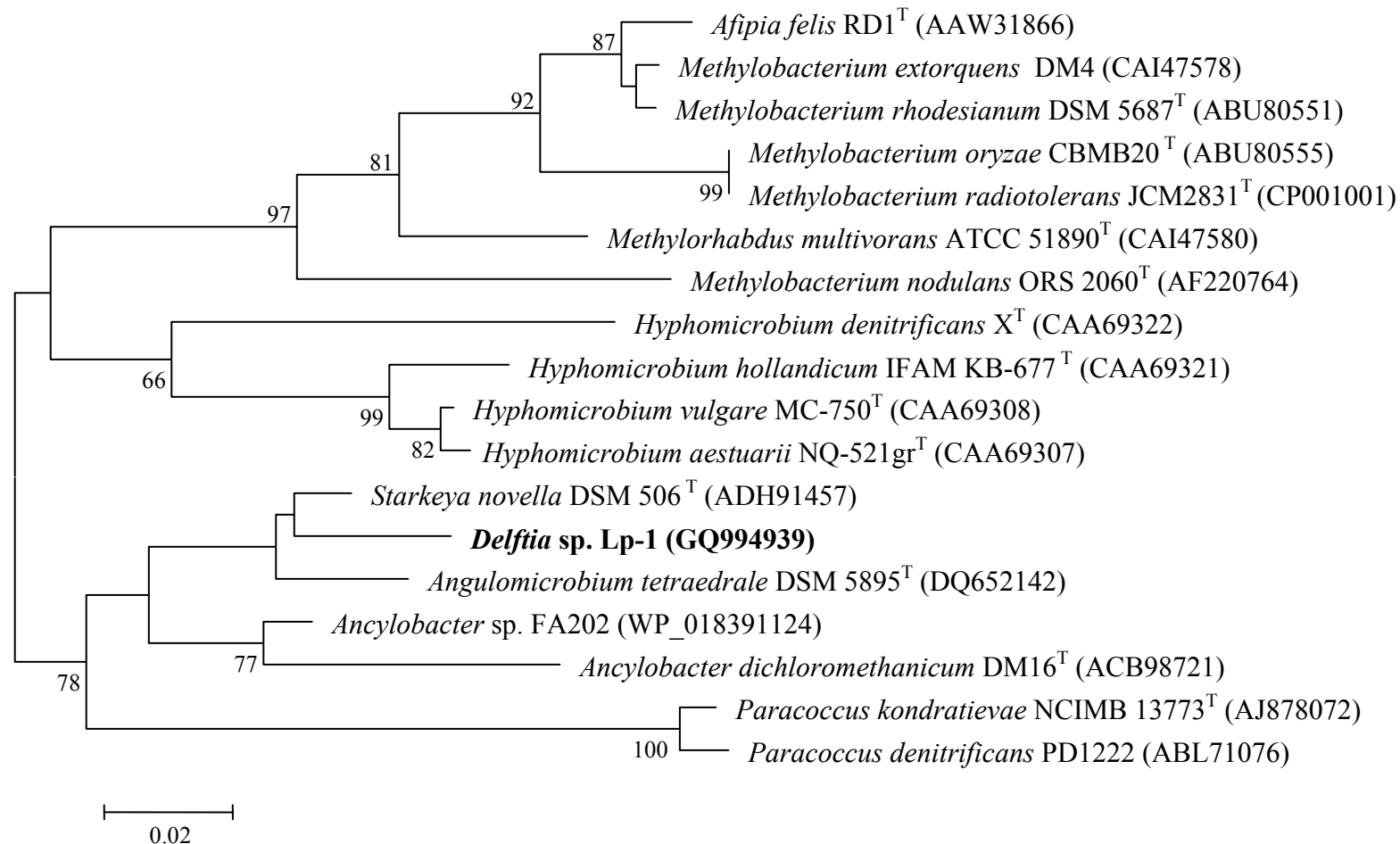


Рис. 18. Филограмма, показывающая положение штамма Lp-1 на основании сравнения аминокислотных последовательностей белка MxaF. Масштаб соответствует 2 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Известно, что у наиболее изученного метилотрофа *Methylobacterium extorquens* AM1 25 генов, вовлеченных в метаболизм метанола до формальдегида, организованы в пять кластеров на хромосоме. Генный *mxa* кластер состоит из 15 генов, из них 14 генов кодируют метанолдегидрогеназу (*mxaFGJIRSACKLDEHB*) и транскрибируются в одном направлении (Zhang, Lidstrom, 2003). Такие гены могут локализоваться в составе мобильных генетических элементов, в том числе на плазмидах. Горизонтальный перенос катаболических генов, находящихся в составе мобильных генетических элементов, обеспечивает широкое распространение и экспрессию этих генов внутри и между бактериальными популяциями. У *Delftia* sp. Lp-1 плазмидная ДНК не обнаружена ни методом щелочного лизиса, ни методом пульс-электрофореза в агарозных блок-вставках.

Однако наличие в хромосоме гена, кодирующего метанолдегидрогеназу, имеющую 85,5-94% сходства с таковыми представителей родов *Angulomicrobium*, *Starkeya* и *Ancylobacter*, также реализующими РБФ путь C₁-метаболизма, может указывать на перенос другими мобильными элементами, например, транспозонами, либо плазмидами, но не поддерживаемыми в данном организме, однако, успевающими передать генетическую информацию новому организму.

Таким образом, нами впервые описан метилотрофный представитель рода *Delftia*, способный расти на метаноле – естественном продукте метаболизма растений. Штамм *Delftia* sp. Lp-1 депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ В-3039, а также в Немецкой коллекции микроорганизмов (DSMZ) под номером DSM 24446. Последовательности генов 16S рПНК и *mxaF* штамма *Delftia* sp. Lp-1 депонированы в GenBank под номерами GQ994938 и GQ994939, соответственно (Агафонова с соавт., 2017а).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК показал, что штамм Side1 имеет наибольшее сходство с представителями рода *Methylopila*: 98,0% с *Mp. musalis* MUSA^T и *Mp. oligotropha* 2395A^T и только 97,2–97,3% с другими видами рода *Methylopila* (рис. 19).

По данным тепловой денатурации ДНК, содержание Г+Ц пар у исследуемого штамма составляет 65,4 мол. %. Уровень ДНК-ДНК гомологии штамма Side1 с типовыми представителями рода *Methylopila* – *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. capsulata* IM1^T, *Mp. oligotropha* 2395A^T, составил лишь 32, 37 и 34%, соответственно.

По данным секвенирования нуклеотидной последовательности фрагмента гена большой субъединицы метанолдегидрогеназы *mxaF*, штамм Side1 имеет наибольшее сходство с *Mp. jiangsuensis* JZL-4^T и *Mp. helvetica* DM9^T (97,1% идентичности транслированных аминокислотных последовательностей MxaF), *Mp. musalis* MUSA^T (96,0 %), *Mp. capsulata* IM1^T

(95,4 %), *Hansschlegelia plantiphila* S1^T (92,2%), а также *Methylobacterium extorquens* DSM 6343^T (84,2 %) (рис. 20).

Для филогенетической характеристики рода *Methylopila* нами предложено использовать также ген малой субъединицы метиламиндегидрогеназы – *mauA*. Филогенетическое положение штамма Side1, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей белка MauA представлено на рис. 21. Показано, что наибольший процент сходства транслированных аминокислотных последовательностей MauA (98,8%) штамм Side1 имеет с *Methylopila musalis* MUSA^T и некоторыми бактериями других родов: *Methylobacterium chloromethanicum* CM4^T и *M. extorquens* AM1 (97,6%), *Paracoccus denitrificans* SD1 и PD1222 (89,4%), *Hyphomicrobium sulfonivorans* (85,7%).

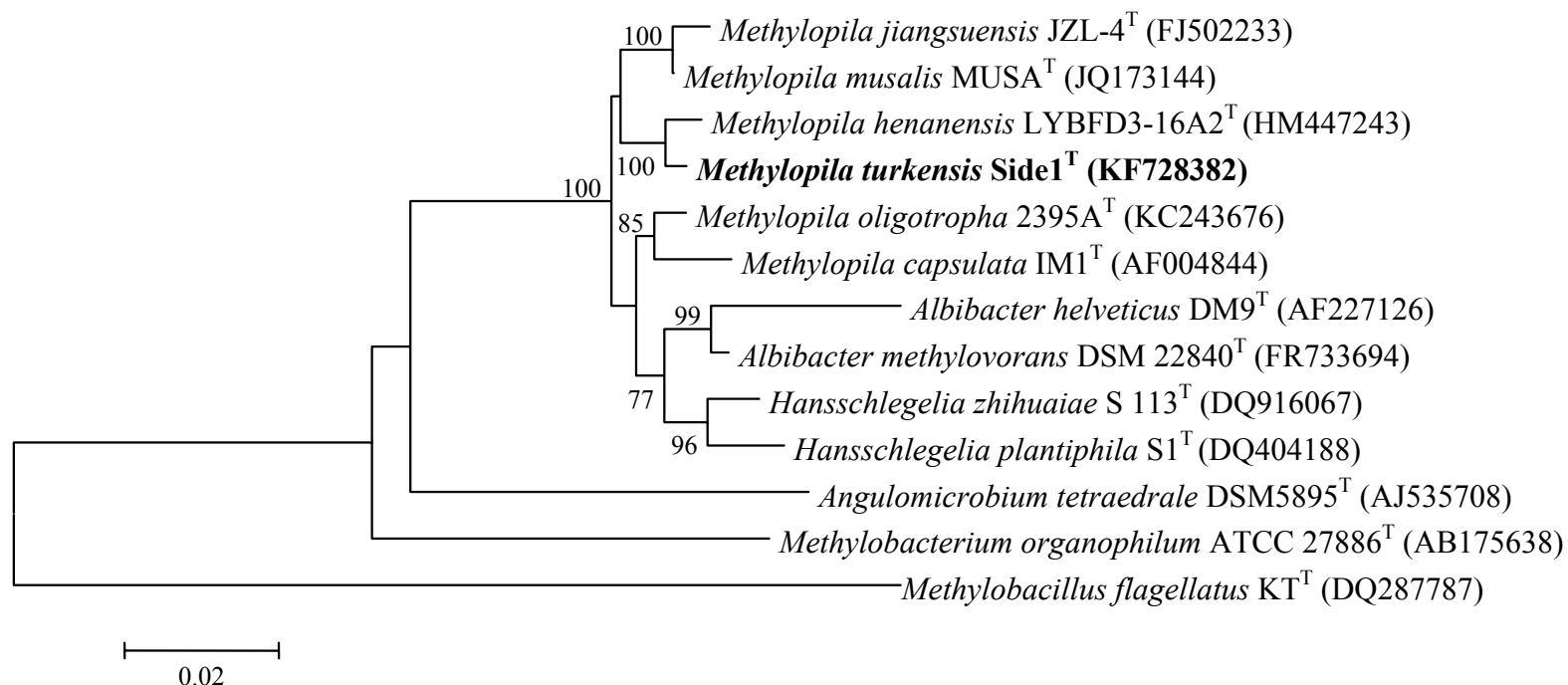


Рис. 19. Филограмма, показывающая положение штамма Side1 на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Methylobacillus flagellatus* KT^T (DQ287787) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

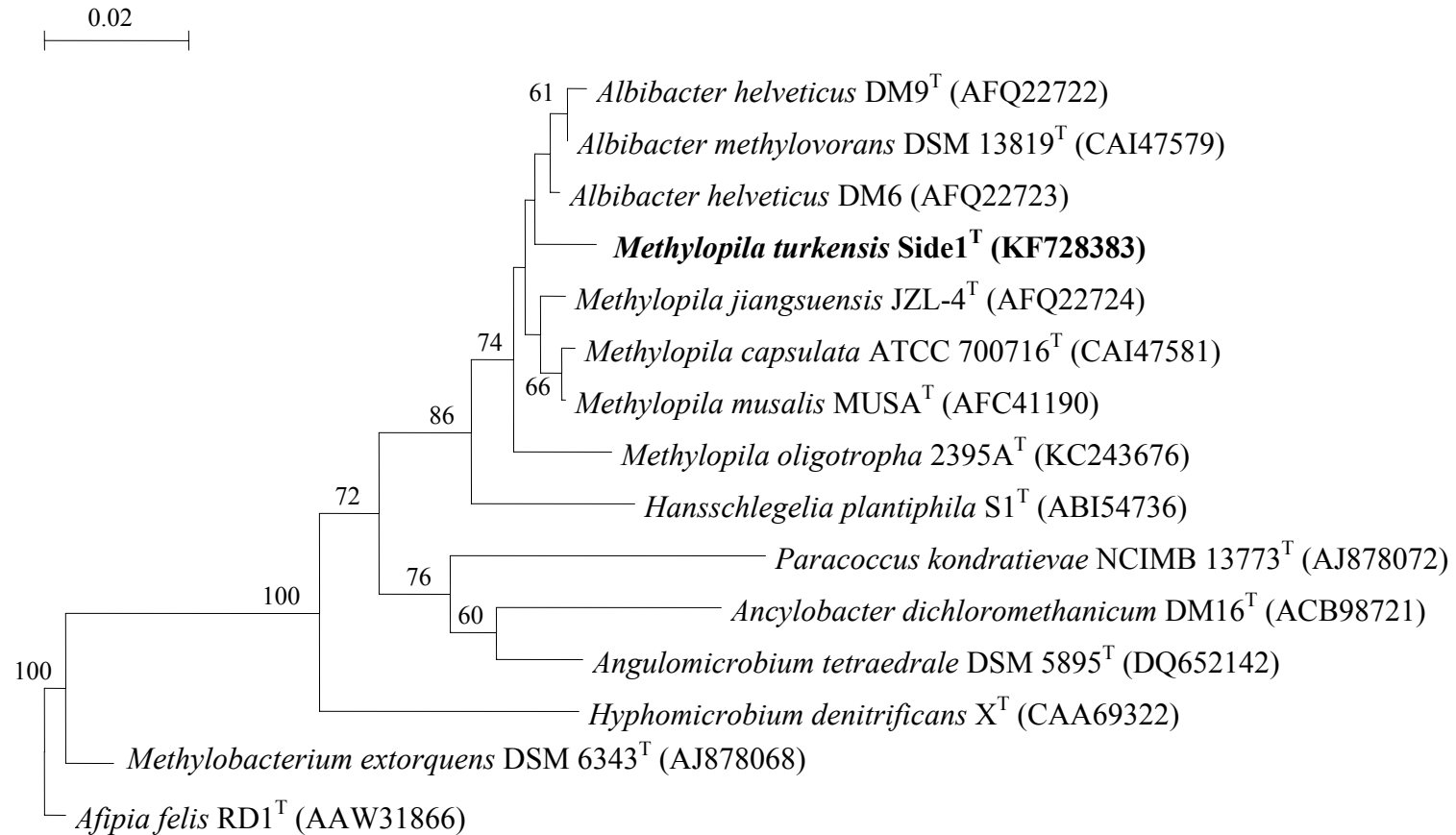


Рис. 20. Филограмма, показывающая положение штамма Side1 на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белка MxaF. Масштаб соответствует 2 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Afipia felis* RD1^T в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

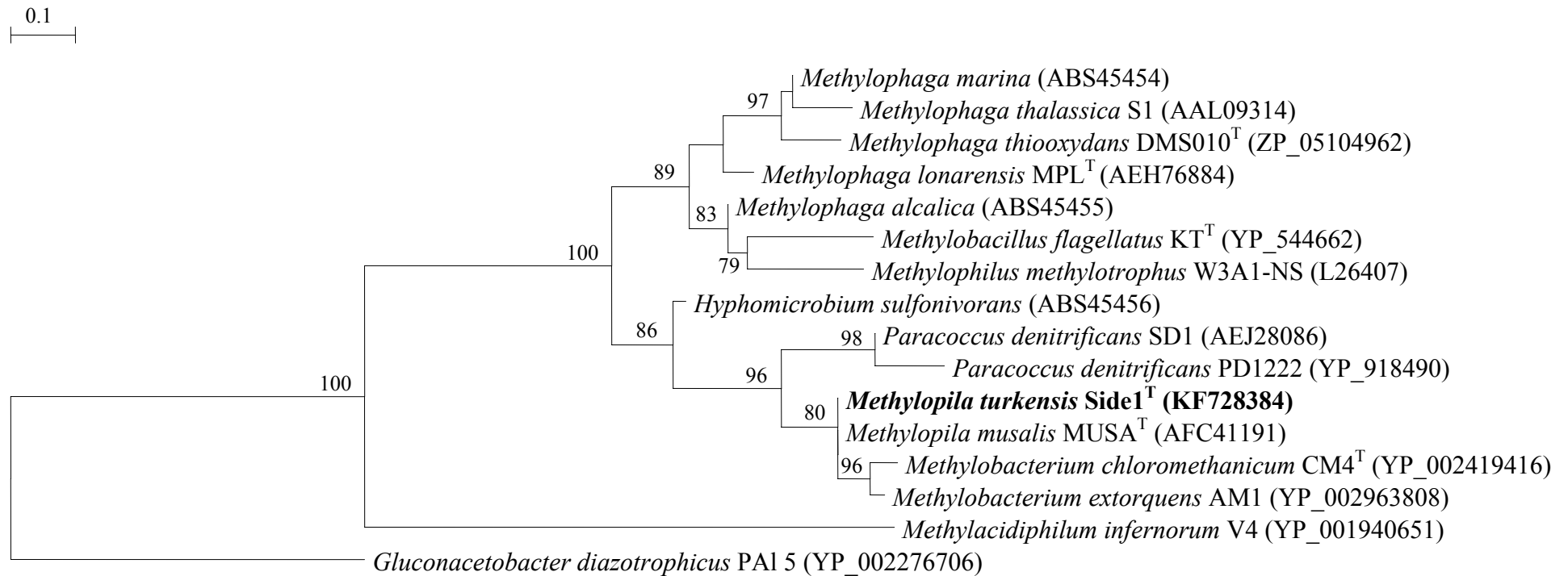


Рис. 21. Филограмма, показывающая положение штамма Side1 на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белка MauA. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 (YP_002276706) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Проведенный анализ масс-спектров препаратов бактериальных клеток представителей рода *Methylopila* показал, что штамм Side1 четко обособляется от всех остальных видов рода *Methylopila* (рис. 22), что подтверждает новый видовой статус исследуемого штамма. Следовательно, отмечено высокое разрешение метода МАЛДИ масс-спектрометрии для идентификации представителей рода *Methylopila* на видовом уровне.

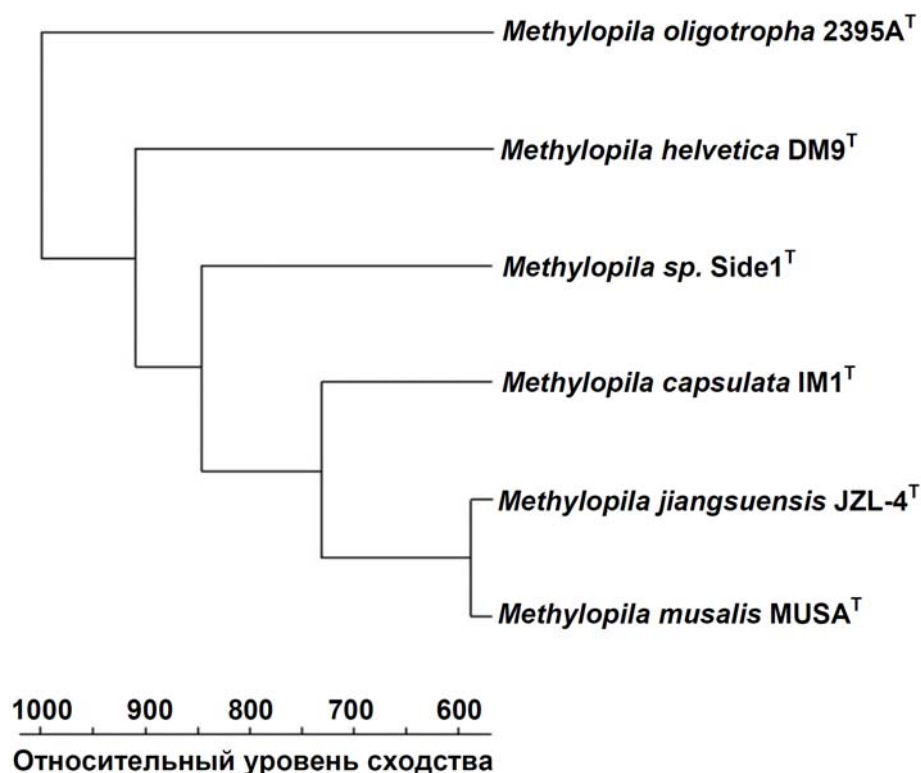


Рис. 22. Дендрограмма суммарных масс-спектров бактерий рода *Methylopila*, построенная с использованием программы BioTyper 2.0 (“Bruker Daltonics”)

Таким образом, на основании вышеперечисленных морфологических, физиологических, хемотаксономических, биохимических и генетических характеристик, штамм Side1 является представителем нового вида, для которого предложено название *Methylopila turkensis* sp. nov (Агафонова с соавт., 2015).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм Osot имеет наибольшее сходство с представителями рода *Ancylobacter* (98,9% с *A. defluvii* SK15^T, 98,0% с *A. rudongensis* DSM 17131^T) (рис. 23). Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма Osot составляет 66,1 мол. %.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка MxaF подтвердил данные, свидетельствующие о высоком уровне сходства штамма Osot с другими видами рода *Ancylobacter* (89,0 - 92,9%) (рис. 24).

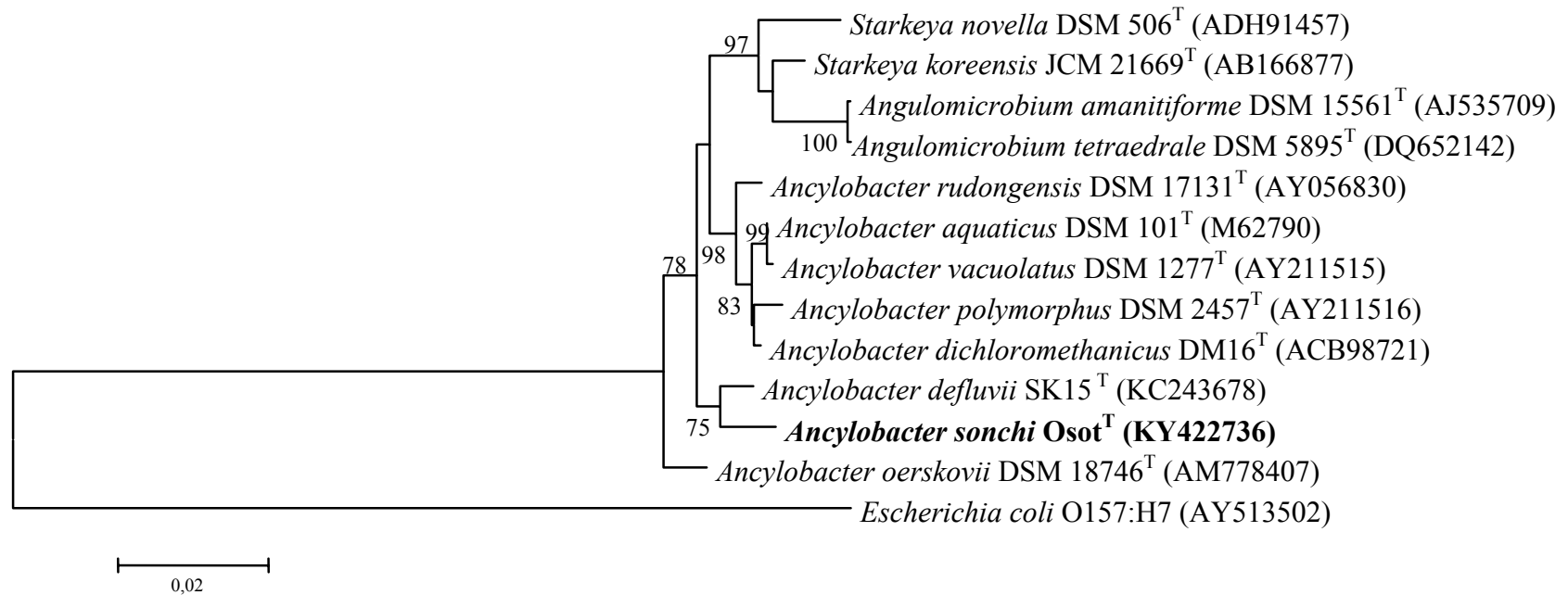


Рис. 23. Филограмма, показывающая положение штамма Osot на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

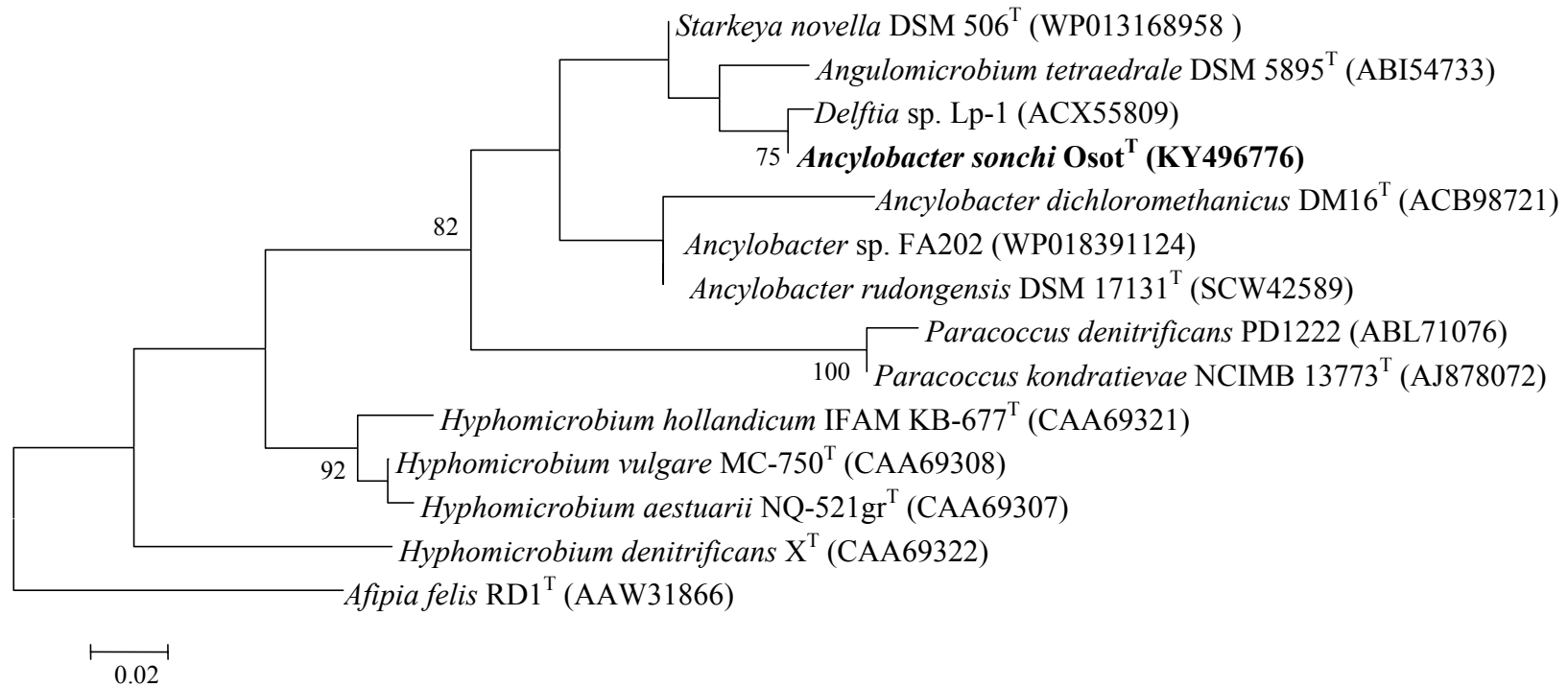


Рис. 24. Филограмма, показывающая положение штамма Osot на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белка MxaF. Шкала соответствует 2 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод максимального правдоподобия (“maximum likelihood”). Корень определяли путем включения последовательности *Afipia felis* RD1^T в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Для определения генотипических различий между штаммом Osot и представителями ближайших родов, использовали метод RAPD. Результаты RAPD-анализа показали, что штамм Osot имеет профиль продуктов амплификации, отчетливо отличающийся от таковых у представителей рода *Ancylobacter* и *Starkeya novella* DSM 506^T количеством полос и их молекулярным весом (рис. 25).

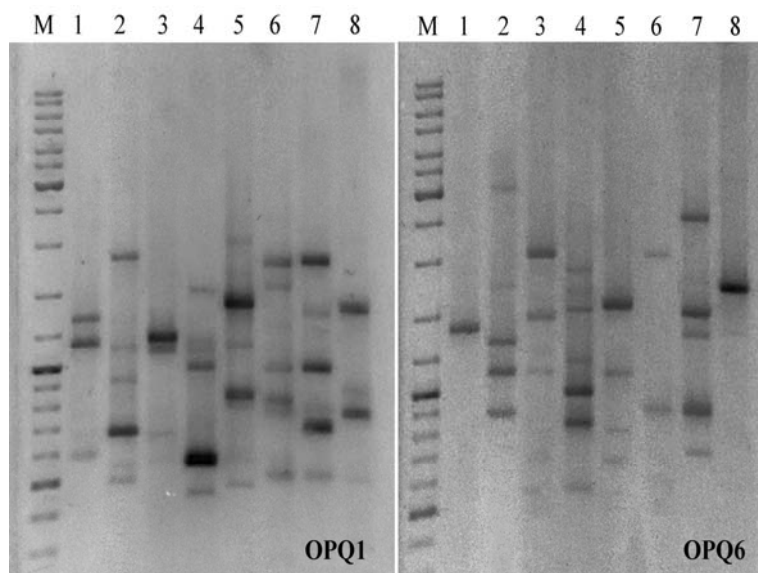


Рис. 25. Электрофореграмма продуктов амплификации OPQ1-, OPQ6-фрагментов (RAPD-ПЦР) из ДНК штаммов: 1 – Osot, 2 – *A. defluvii* VKM B - 2789^T, 3 – *A. vacuolatus* DSM 1277^T, 4 – *A. polymorphus* DSM 2457^T, 5 – *A. aquaticus* DSM 101^T, 6 – *A. rudongensis* DSM 17131^T, 7 – *A. dichloromethanicus* VKM B - 2484^T, 8 – *Starkeya novella* DSM 506^T. М – маркер молекулярных масс (GenRuler DNA ladder mix, Fermentas).

Согласно результатам ДНК-ДНК гибридизации, уровень ДНК-гомологии штамма Osot со штаммами *A. defluvii* SK15^T и *A. rudongensis* AS1.1761^T составляет 27 и 29%, соответственно.

Дифференцирующие характеристики типовых культур рода *Ancylobacter* суммированы в табл. 8. Интересно, что большинство представителей рода *Ancylobacter* были выделены из образцов воды и почвы, только *A. rudongensis* был выделен из ризосферы спарты (*Spartina anglica* C.E.Hubb).

На основании полученных результатов штамм Osot отнесен к новому виду, для которого предложено название *Ancylobacter sonchi* sp. nov (Agafonova et al., 2017).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что штамм OV имеет наибольшее сходство с представителями рода *Methylobacillus*: 99,6% с *Mb. gramineus* Lap^T и 98,7% с *Mb. glycogenes* TK 0113^T (рис. 26).

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка MxaF демонстрирует, что штамм OV имеет 100% сходство с *Methylobacillus flagellatus* КТ^T (рис. 27).

Таблица 8. Дифференцирующие характеристики типовых представителей рода *Ancylobacter*.

Штаммы: 1, Osot; 2, *A. dichloromethanicus* DM16^T; 3, *A. aquaticus* DSM 101^T; 4, *A. rudongensis* DSM 17131^T; 5, *A. polymorphus* DSM 2457^T; 6, *A. vacuolatus* DSM 1277^T; 7, *A. oerskovii* DSM 18746^T. Данные по *A. dichloromethanicus* DM16^T; *A. oerskovii* DSM 18746^T; *A. rudongensis* DSM 17131^T; *A. aquaticus* DSM 101^T; *A. vacuolatus* DSM 1277^T; *A. polymorphus* DSM 2457^T из Firsova et al. (2009). н.о. – не определяли; +/- – слабый рост.

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7
Морфология клеток	палочковидные	бобовидные	бобовидные	бобовидные	бобовидные	бобовидные	плеоморфные
Максимальная температура роста на агаризованной среде (°C)	30	37	34	40	42	37	40
Рост при 3% NaCl	–	–	–	+	+	–	+
Нитратредукция	–	–	+	–	–	+	–
Уреаза	+	+	+	+	–	+	+
Гидролиз желатины	–	–	–	+	+	+	–
Рост на дихлорметане	–	+	–	–	–	–	н.о.
API 20NE:							
Нитратредукция	–	–	+	–	–	–	–
Уреаза	+	–	–	–	–	+	+
Гидролиз эскулина	+	+	+	+	+	+	+/-
β -Галактозидаза	+	+	+	+	+	+	–
Ассимиляция арабинозы	+	+	–	+	+	+	+
Ассимиляция глюконата	+	+/-	–	–	–	+	+
Ассимиляция малата	–	–	–	–	+	–	+
API 50CH:							
Ростовые субстраты:							
Глицерин	+	+/-	–	+	–	–	–
L-Арабиноза	+	+	–	+	+	+	+
D-Ксилоза	+	+	+/-	+	+	–	+/-
Фруктоза	+	+/-	–	+	+/-	+/-	+
Рамноза	+	–	–	–	–	–	+
Сорбит	+	+/-	–	+	+	+	+
Эскулин	+	+	+	+	–	+/-	–
Источник выделения штамма	Корни <i>Sonchus arvensis</i> L.	Загрязненная почва	Почва	Ризосфера <i>Spartina anglica</i> C.E.Hubb	Речной ил	Почва	Почва

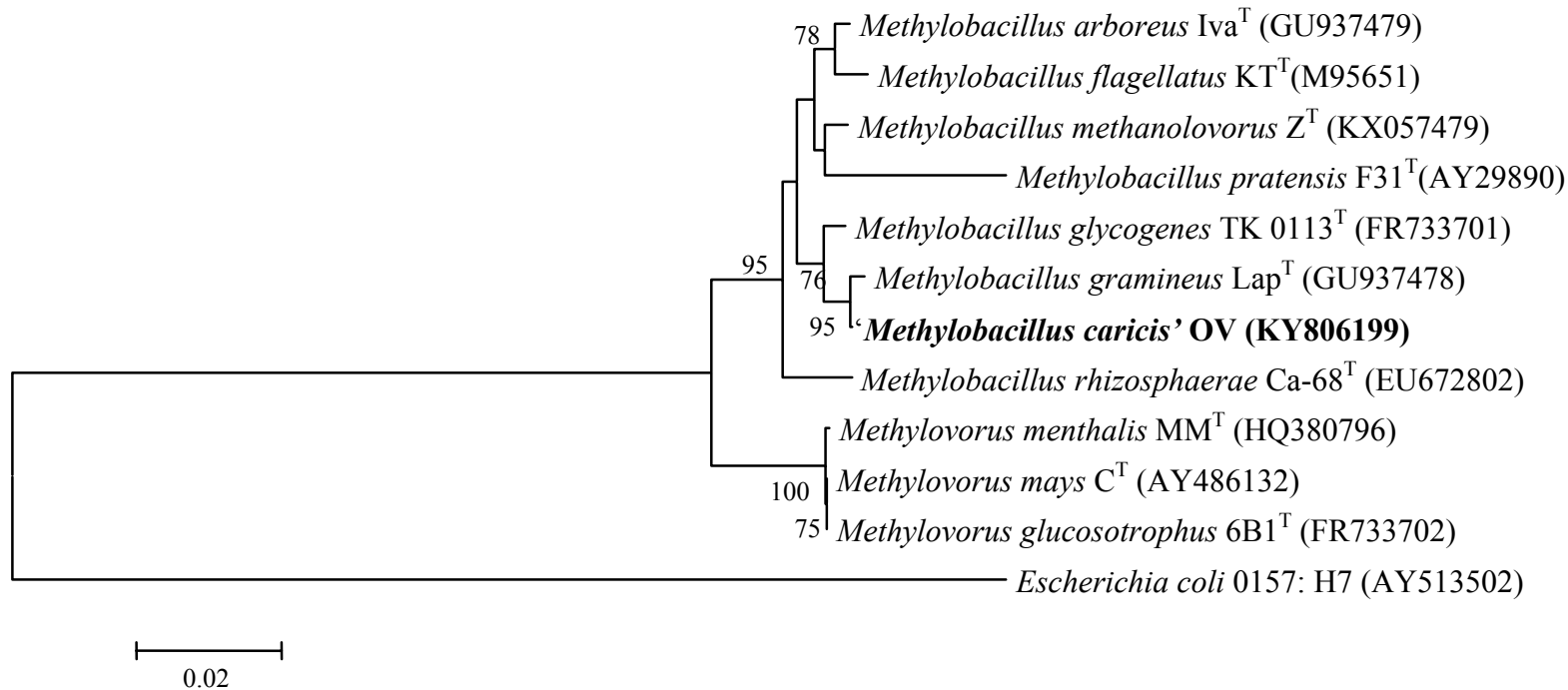


Рис. 26. Филограмма, показывающая положение штамма OV на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генf 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Escherichia coli* O157:H7 (AY513502) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

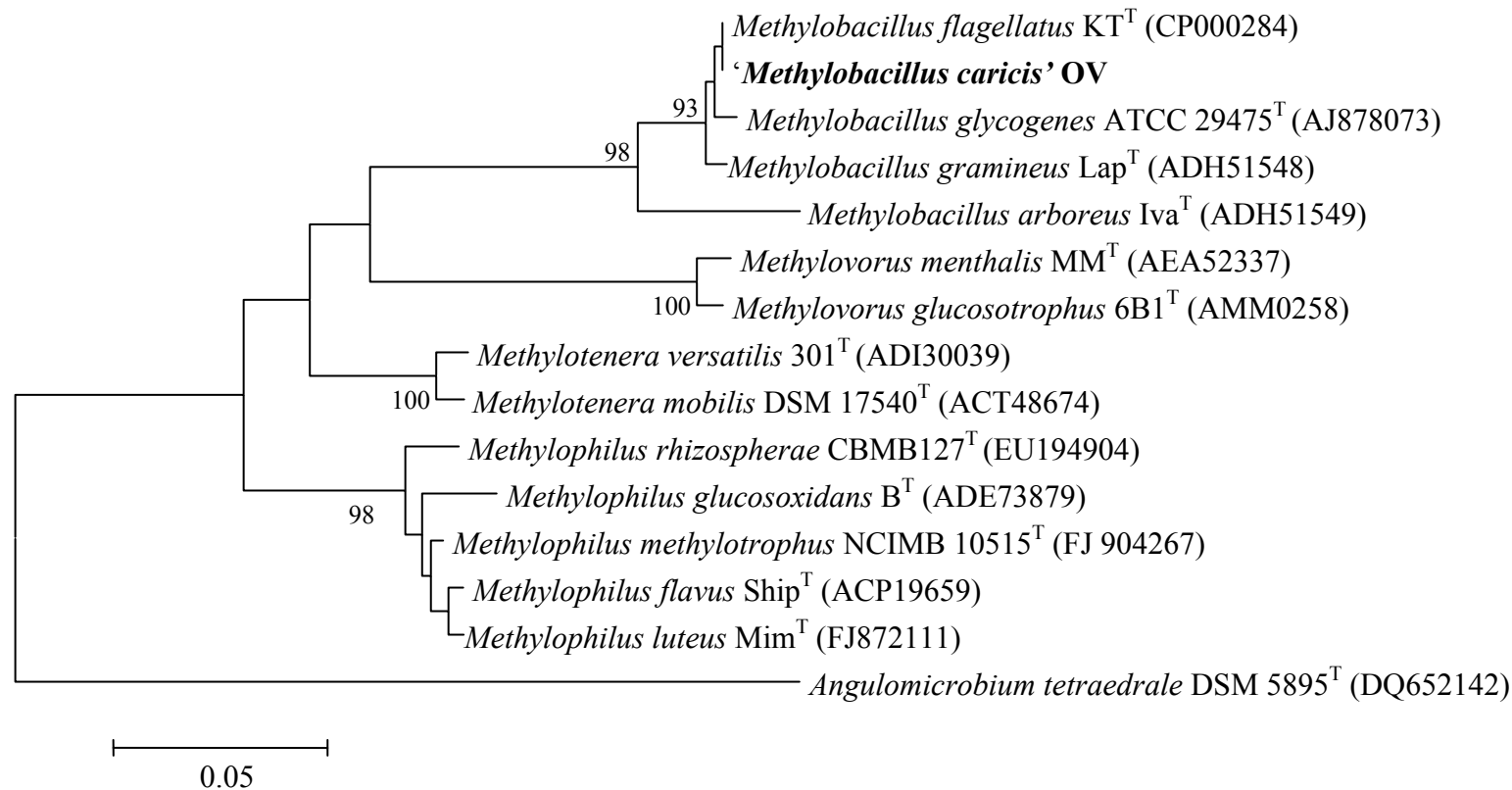


Рис. 27. Филограмма, показывающая положение штамма OV на основании сравнительного анализа аминокислотных последовательностей белка MxaF. Шкала соответствует 5 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей ("neighbor-joining"). Корень определяли путем включения последовательности *Angulomicrobium tetraedrale* DSM 5895^T (DQ652142) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма OV составляет 51,4 мол. %. Согласно результатам ДНК-ДНК гибридизации, уровень гомологии между штаммом OV и *Mb. gramineus* Lap^T составляет лишь 52%, что свидетельствует о принадлежности штаммов к разным видам.

Для определения генотипических различий между штаммом OV и *Mb. gramineus* Lap^T и *Mb. glycogenes* ТК 0113^T использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ) (рис. 28).

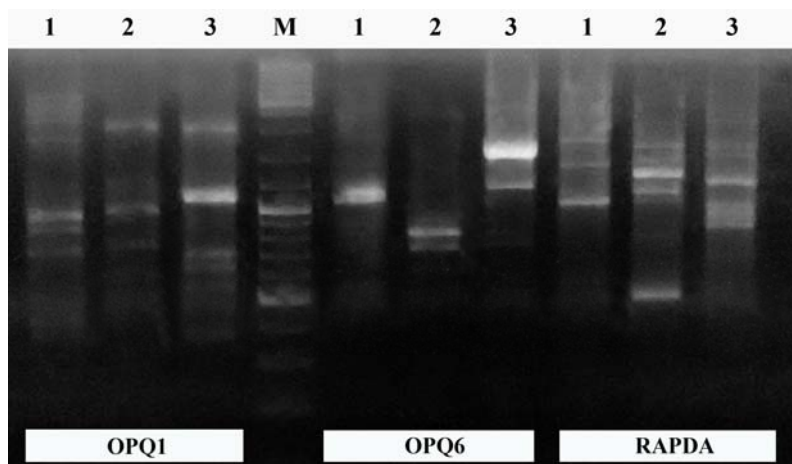


Рис. 28. Электрофореграмма продуктов амплификации OPQ1-, OPQ6- и RAPDA-фрагментов (RAPD-ПЦР) из ДНК штаммов: 1 – ‘*Mb. caricis*’ OV, 2 – *Mb. gramineus* Lap^T, 3 – *Mb. glycogenes* ТК 0113^T. М – маркер молекулярных масс (GenRuler DNA ladder mix, Fermentas).

Результаты RAPD-анализа показали, что штаммы OV, Lap^T и ТК 0113^T имеют различные паттерны продуктов амплификации, что свидетельствует о том, что штаммы представляют собой отдельные виды.

Кроме того, в профилях полярных липидов штаммов *Mb. gramineus* Lap^T и *Mb. glycogenes* ТК 0113^T наблюдали наличие нескольких неидентифицированных аминокислот, которые отличают известные виды от профиля штамма OV (рис. 29).

Дифференцирующие характеристики нового вида представлены в табл. 9.

Таким образом, штамм OV на основании исследования фено- и генотипических признаков отнесен к новому виду, для которого мы предлагаем название ‘*Methylobacillus caricis*’ sp. nov (Агафонова с соавт., 2017b) (полные диагнозы новых таксонов приведены в разделе диссертации Диагнозы новых таксонов).

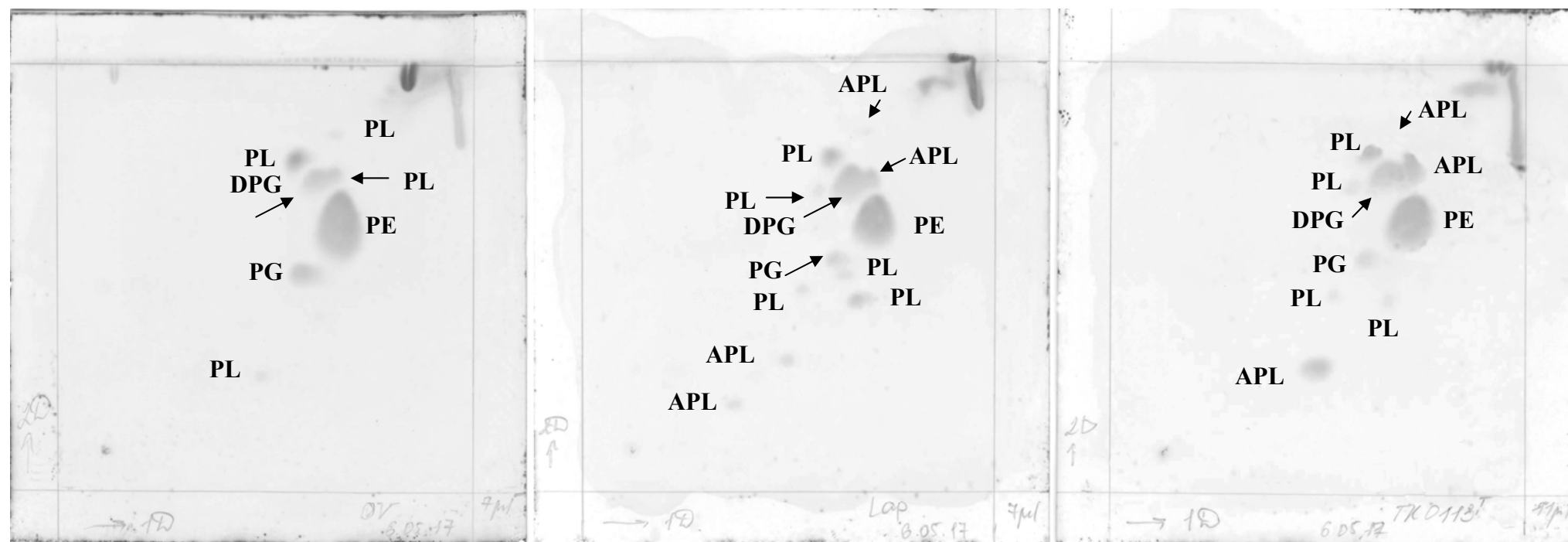


Рис. 29. Полярные липиды штаммов '*Mb. caricis*' OV (1), *Mb. gramineus* Lap^T (2) и *Mb. glycogenes* TK 0113^T (3) после разделения двумерной тонкослойной хроматографией: фосфатидилглицерол (PG); фосфатидилэтаноламин (PE); дифосфатидилглицерин (DPG); неидентифицированные аминокислотные фосфолипиды (APLs); неидентифицированные фосфолипиды (PLs).

Таблица 9. Основные характеристики, дифференцирующие виды рода *Methylobacillus*.

1 – '*Mb. caricis*' OV; 2 – *Mb. gramineus* (Gogleva et al., 2011); 3 – *Mb. methanolivorans* (Kaparullina et al., 2017); 4 – *Mb. rhizosphaerae* (Madhaiyan et al., 2013); 5 – *Mb. glycogenes* (Yordy, Weaver, 1977; Urakami, Komagata, 1987); 6 – *Mb. flagellatus* (Говорухина с соавт., 1987); 7 – *Mb. pratensis* (Doronina et al., 2004); 8 – *Mb. arboreus* (Gogleva et al., 2011).

*v – варьирует.

Характеристика	1	2	3	4	5	6	7	8
Морфология: Окраска колоний (диаметр)	Бесцветные (< 1мм)	Белые (4-5 мм)	Бесцветные (1-2 мм)	Кремово-белые (6-8 мм)	От белого до желтого (1-3 мм)	Молочного цвета	Белые (1-2 мм)	Белые (2 мм)
Размер клеток, мкм	0,5-0,6×1,8-2,0	0,5-0,55×1,1-1,2	0,4-0,8×1,0-2,5	0,2-0,27×0,5-0,74	0,3-0,5×1,8-2,0 (0,5-0,8×1,0-1,6)	0,5-0,6×1,4-1,8	0,5-0,7×0,9-1,8	0,3-0,35×1,2-1,25
Подвижность	+	+	v	+	–	+	+	+
Рост на метиламине	–	–	v	+	+	+	+	–
Уреаза	–	–	+	–	+	+	+	–
Образование ацетона	–	+	–	+	–	–	–	+
Гидролиз крахмала	+	+	+	–	–	+	+	+
Нитратредукция	–	–	+	–	+	+	+	–
Оптимум температур, °C	22-29	19-24	29-35	25-30	30-33	42	25-30	19-24
Рост при: 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	–	–	–	–	–	+	–	–
3% (в/об) NaCl	+	–	–	–	–	–	–	+
Оптимум pH	7,5-8,5	7,2-7,8	6,5-7,5	6,5-8,0	6,0-8,0	7,2-7,3	6,5-7,5	7,9-8,5
Г+Ц ($T_{пл}$) (мол. %)	51,4	50,5	51,0	59,7	53,2	55,5	61,5	54,0

5.3. Синтез фитогормонов аэробными метилотрофными бактериями, ассоциированными с растениями

5.3.1. Синтез ауксинов

Обнаружено, что независимо от таксономического положения все выделенные нами чистые культуры метилотрофных бактерий синтезируют индолпроизводные – фитогормоны ауксины. Триптофан является одним из предшественников синтеза индолилуксусной кислоты (ИУК) у микроорганизмов и растений и содержится в растительных эксудатах. Культуральная жидкость метиловых бактерий, выращенных до ОП₆₀₀=1,5 на нитратной минеральной среде с добавлением L-триптофана, окрашивалась реактивом Сальковского в красный цвет, что свидетельствовало о способности исследуемых штаммов синтезировать индольные соединения, концентрация которых составляла от 3 до 50 мкг/мл (табл. 5).

5.3.2. Синтез гиббереллинов

Известно, что многие метилотрофы являются фитосимбионтами, реализуя разные стратегии положительного влияния, в частности, синтезируют фитогормоны – ауксины и цитокинины (Доронина с соавт., 2015). Образование другого класса фитогормонов – гиббереллинов – до настоящего времени у метилотрофов не было установлено.

Предварительный анализ культуральной жидкости нескольких штаммов метиловых бактерий на наличие гиббереллинов выявил заметное их образование у *Methylobacillus arboreus* Iva^T.

Методом тонкослойной хроматографии удалось разделить экстракт культуральной жидкости *Mb. arboreus* Iva^T на пластинах с силикагелем и установить в нем наличие пяти компонентов со значениями R_f, равными 0,07, 0,32, 0,50, 0,62 и 0,72. После обработки раствором серной кислоты в этаноле собственная флуоресценция пластинки исчезла, что позволило нам увидеть флуоресценцию пятен: зеленую (R_f 0,07 и 0,32) и голубую (R_f 0,50 и 0,62). Величина R_f стандарта (гибберелловая кислота GA₃) составила 0,31, пятно имело зеленую флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Экстракт вещества со значением R_f = 0,32 отобрали для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ. В пробе обнаружено наличие небольшого пика (6,5 мин), соответствующего времени удержания стандарта. Проведенный далее анализ ЖХ/МС анализ этого вещества подтвердил структуру гибберелловой кислоты GA₃ у метилотрофа *Mb. arboreus* Iva^T (рис.30). Несмотря на то, что растения, грибы и некоторые бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют гиббереллины, известно только несколько примеров того, как происходит фрагментация GA₃ методом ЖХ/МС, и наши результаты согласуются с данными по фрагментации родительского иона [M-H]⁺ гибберелловой кислоты GA₃, описанными ранее (Prasad et al., 2010; Zhao et al., 2013).

Концентрация гибберелловой кислоты GA_3 у *M. arboreus* Iva^T составила $3,18 \pm 0,23$ нг/мл культуральной жидкости.

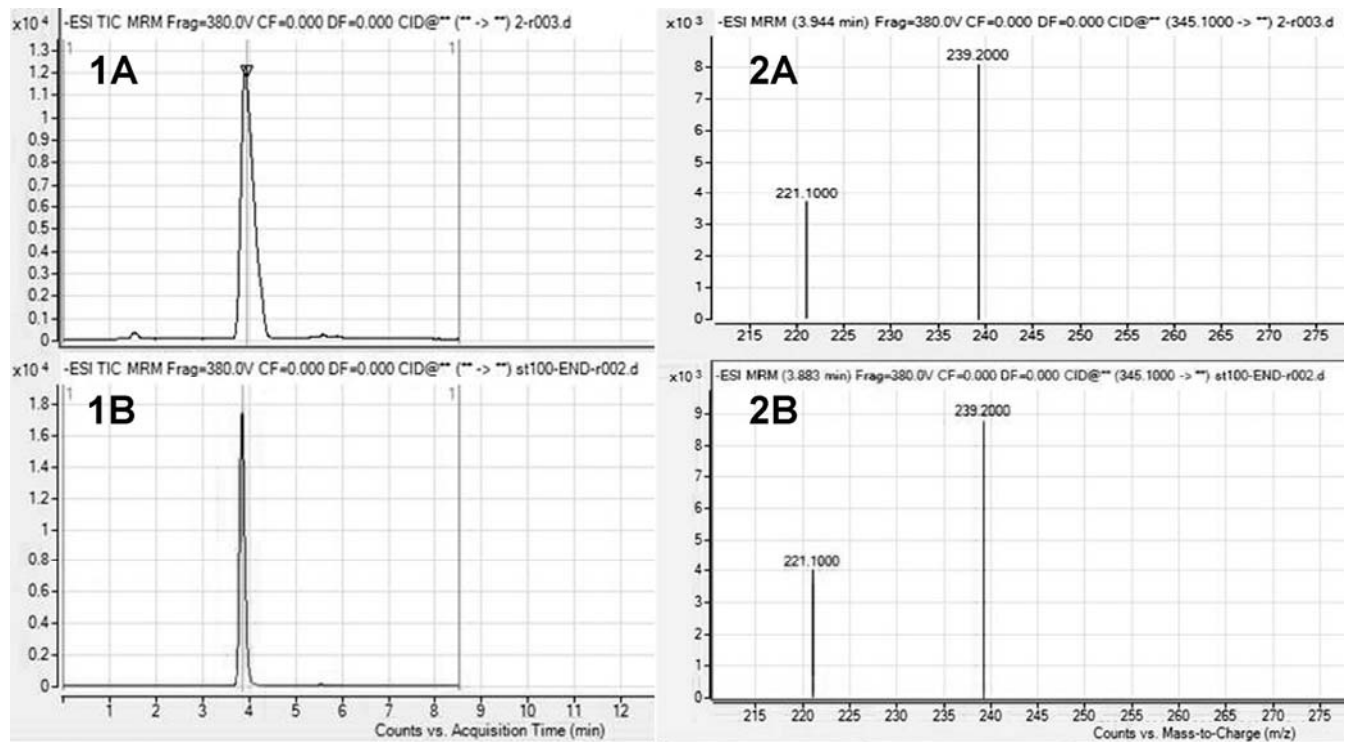


Рис. 30. MRM-хроматограммы (1) и масс-спектры фрагмент-ионов (2) экстракта культуральной жидкости *Methylobacillus arboreus* Iva^T (А) и гибберелловой кислоты GA_3 (100 нг/мл) (В).

Метанольный экстракт, содержащий синтезируемую *Mb. arboreus* Iva^T гибберелловую кислоту GA_3 , использовали в биотестах по влиянию на рост гипокотилей салата (*Lactuca sativa* L.). Длина гипокотилей, обработанных экстрактом *Mb. arboreus* Iva^T ($3,30 \pm 0,17$ см) (рис. 31.2), в 1,4-1,8 раза превышала длину гипокотилей в отрицательном контроле ($2,16 \pm 0,15$ см) (рис.31.1), но была близка длине гипокотилей в положительном контроле ($3,42 \pm 0,20$ см) (рис.31.3). Следовательно, обработка экстрактом культуральной жидкости *Mb. arboreus* Iva^T стимулировала удлинение ростков салата.

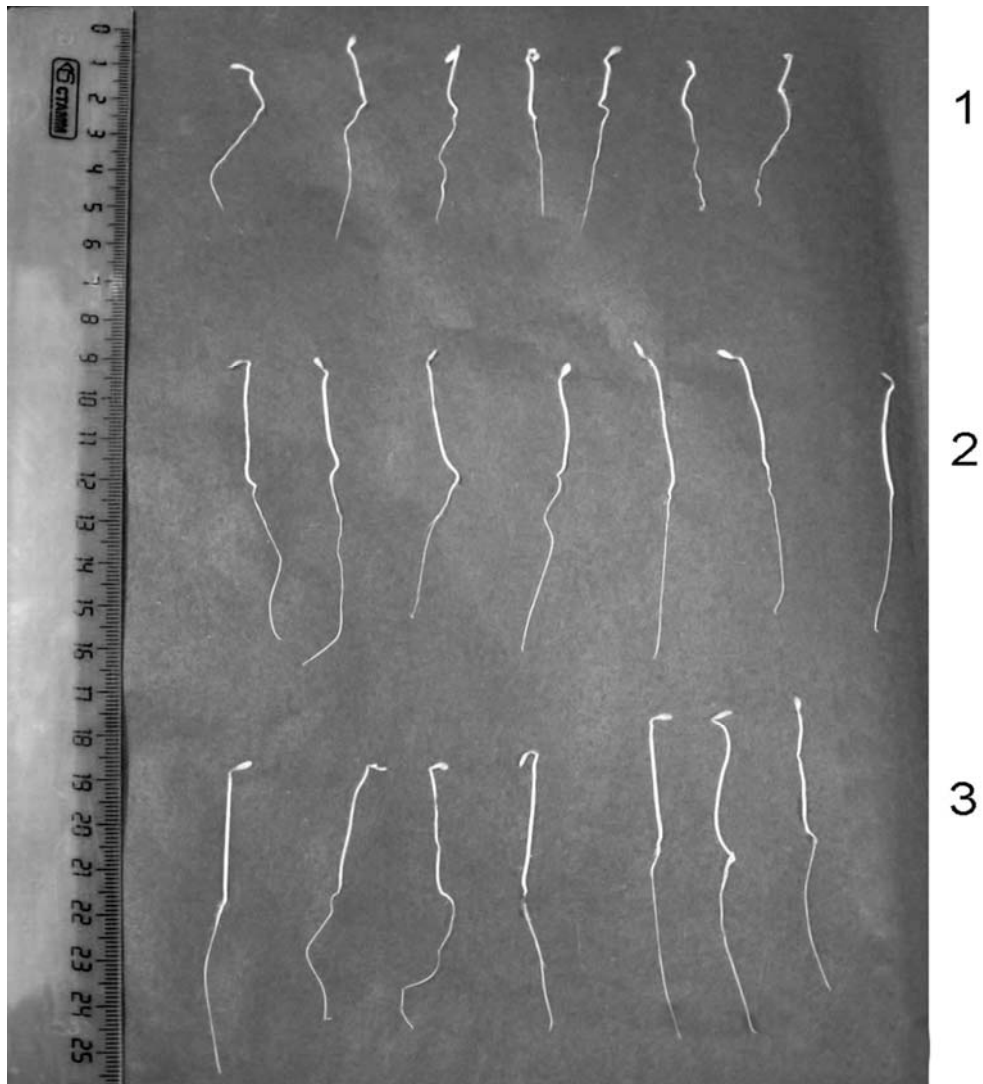


Рис. 31. Ростки салата (*Lactuca sativa* L.) после обработки 1 – 5%-м метанолом, 2 – экстрактом культуральной жидкости *Methylobacillus arboreus* Iva^T в 5%-ом метаноле, 3 – гибберелловой кислотой GA₃ в 5%-ом метаноле (3,5 нг/мл).

Известно, что гиббереллины являются стимуляторами роста растений, однако в последнее время появилось множество работ, подтверждающих взаимосвязь между GA-сигналингом (посредством DELLA-белков) и стрессоустойчивостью растений (Achard et al., 2008; Masood et al., 2016). Также известно влияние гиббереллинов на повышение содержания фотосинтетических пигментов и защиту фотосинтетического аппарата зеленых водорослей в условиях загрязнения тяжелыми металлами (Falkowska et al., 2011) и растений кукурузы при солевом стрессе (Tuna et al., 2008). Нами показано (см. раздел 5.9.), что колонизация растений гороха штаммом *Mb. arboreus* Iva^T в условиях гербицидного стресса (паракват) стимулировала рост, повышала содержание фотосинтетических пигментов и стрессоустойчивость растений. Вероятно, наряду с другими механизмами положительного влияния микроба на растения

это обусловлено и синтезом гибберелловой кислоты. Следовательно, выявлен новый механизм в основе диалога метилотрофного фитосимбионта *Mb. arboreus* Iva^T с растениями.

5.4. Фосфатсольюбилизирующая активность

Способность метиловобактерий к сольюбилизации фосфатов исследовали на агаризованной минеральной среде "К" с нерастворимым $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора. Через 10 сут культивирования вокруг колоний ряда исследуемых штаммов (*Delftia* sp. Lp-1, *Mb. extorquens* G10, *A. sonchi* Osot^T и *Mp. musalis* MUSA^T) появились зоны просветления, свидетельствующие о растворении трикальцийфосфата (рис. 32).

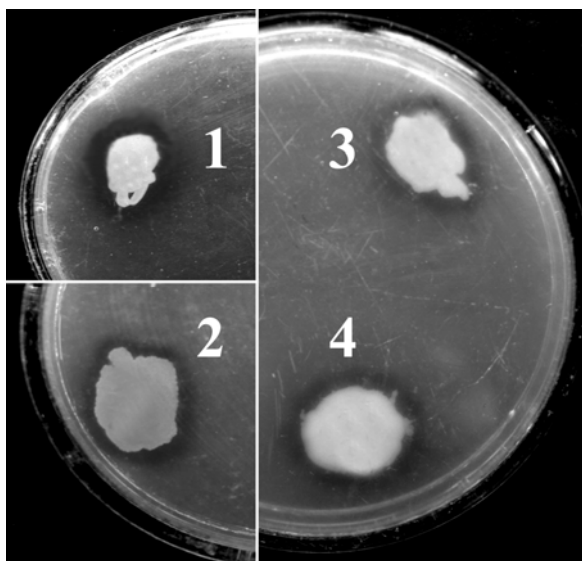


Рис. 32. Фосфатсольюбилизирующая активность штаммов *Delftia* sp. Lp-1 (1), *M. extorquens* G10 (2), *A. sonchi* Osot^T (3) и *Mp. musalis* MUSA^T (4) на агаризованной питательной среде с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Несмотря на отсутствие явно выраженных зон просветления у других культур на агаризованной среде, все исследуемые штаммы на жидкой среде с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ растворяли неорганический фосфор. 11 штаммов метиловобактерий: *M. extorquens* G10 и Ps2, *M. nodulans* ORS2060^T, *A. sonchi* Osot^T, *Mph. flavus* Ship^T, *Mv. mays* C^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mb. arboreus* Iva^T, *Mv. menthalis* MM^T, *Mv. glucosotrophus* 34, *Mp. turkensis* Side1^T – растворяли трикальцийфосфат с концентрацией растворенного фосфора от 120 до 160 мкг/л культуральной жидкости, тогда как 3 штамма: *Delftia* sp. Lp-1, *Mp. capsulata* Sb и Minsk, – показали бóльшую фосфатсольюбилизирующую активность – от 230 до 280 мкг/л культуральной жидкости (табл. 10).

Следует отметить, что исследуемые штаммы реализуют разные пути C₁-метаболизма и, соответственно, имеют разные скорости роста. Титр клеток в процессе культивирования

увеличивался с $2 \cdot 10^3$ – $6,4 \cdot 10^4$ при засеве до $2,3 \cdot 10^4$ – $2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл в конце эксперимента (7 сут).

Таблица 10. Солюбилизация фосфатов метиловыми бактериями при росте на минеральной среде “К” с метанолом и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ после 7 сут культивирования

Штамм	Концентрация фосфора, мкг/л
<i>Methylophilus flavus</i> Ship ^T	124,4
<i>Methylobacterium extorquens</i> G10	150,7
<i>Methylobacterium extorquens</i> Ps2	139,7
<i>Methylobacillus arboreus</i> Iva ^T	180,9
<i>Methylovorus menthalis</i> MM ^T	117,6
<i>Methylopila musalis</i> MUSA ^T	172,2
<i>Methylovorus mays</i> C ^T	165,4
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS2060 ^T	236,6
<i>Delftia</i> sp. Lp-1	237,4
<i>Ancylobacter sonchi</i> Osot ^T	178,1
<i>Methylopila capsulata</i> Minsk	271,7
<i>Methylopila capsulata</i> Sb	268,3
<i>Methylopila turkensis</i> Side1 ^T	167,3
<i>Methylovorus glucosotrophus</i> 34	131,7

Показаны средние данные трех независимых экспериментов (стандартное отклонение не более $\pm 5\%$)

При росте на полноценной среде с KH_2PO_4 культуры достигали такой плотности клеток через 2-3 сут. Однако на среде без доступного источника фосфора их рост тормозился, и у всех исследуемых штаммов наблюдали лаг-фазу (2 сут), что, вероятно, объясняется накоплением метаболитов, необходимых для растворения фосфатов. В контроле с полным отсутствием источника фосфора (KH_2PO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) исследуемые метиловы бактерии не росли. В стерильной среде с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ через 7 сут инкубации контрольных колб при 28°C и 150 об/мин растворимый фосфор не обнаружен.

Delftia sp. Lp-1, *Mb. arboreus* Iva^T, *Mp. turkensis* Side1^T, *Mp. capsulata* Minsk и Sb, *Mp. musalis* MUSA^T, *A. sonchi* Osot^T, *Mv. glucosotrophus* 34 накапливали максимальное количество фосфатов к 7 сут роста, другие метиловы бактерии (*M. extorquens* G10 и Ps2, *Mv. menthalis* MM^T, *Mph. flavus* Ship^T, *M. nodulans* ORS2060^T, *Mv. mays* C^T) – к 5 и 7 сут (рис. 33).

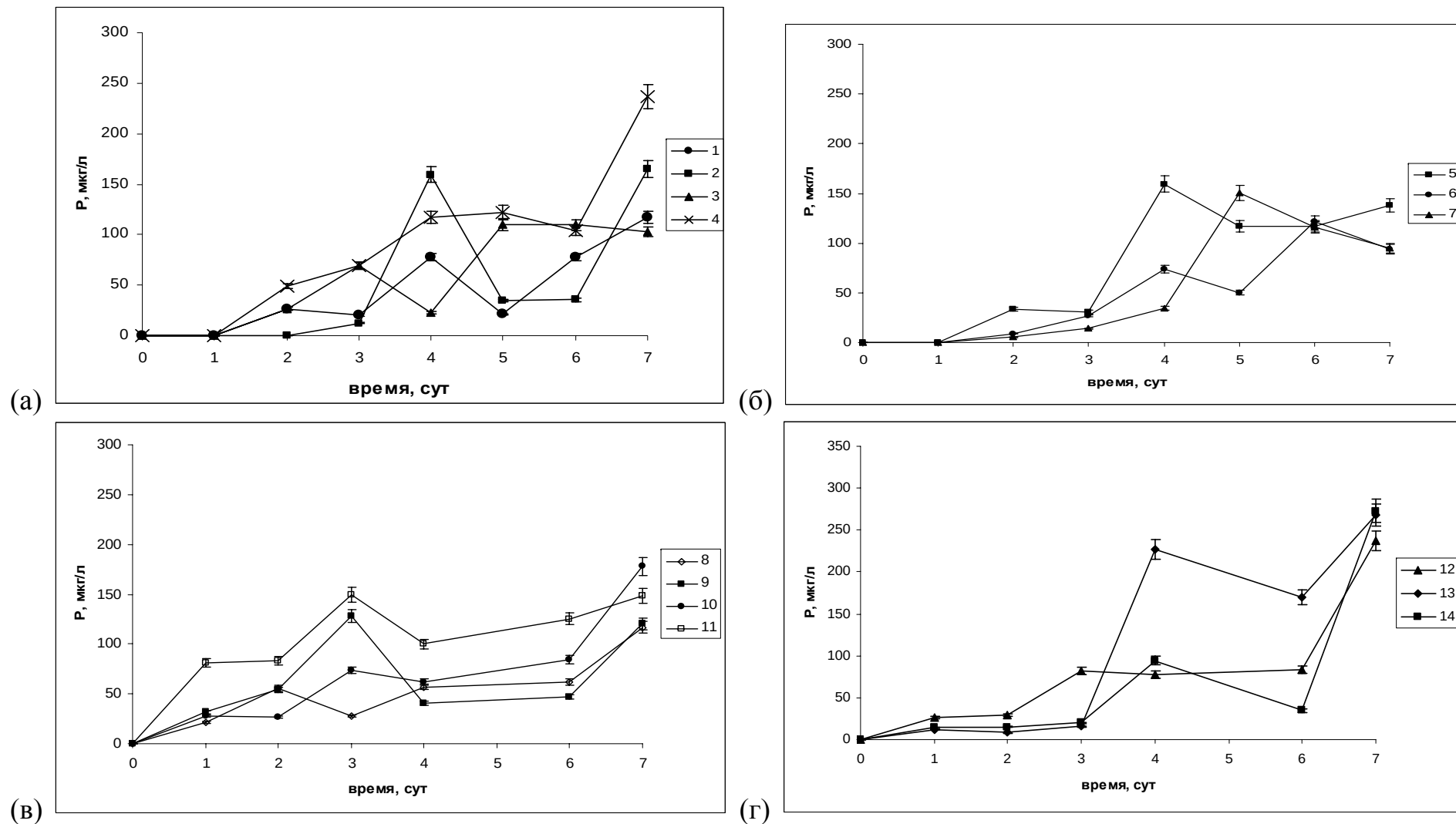


Рис. 33. Накопление фосфора при культивировании исследуемых штаммов на жидкой питательной среде с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. (а) 1 – *Mv. menthalis* MM^T, 2 – *Mv. mays* C^T, 3 – *M. nodulans* ORS2060^T, 4 – *M. extorquens* Ps2, (б) 5 – *Mb. arboreus* Iva^T, 6 – *Mph. flavus* Ship^T, 7 – *M. extorquens* G10, (в) 8 – *Mp. turkensis* Side1^T, 9 – *Mv. glucosotrophus* 34, 10 – *A. sonchi* Osot^T, 11 – *Mp. musalis* MUSA^T, (г) 12 – *Delftia* sp. Lp-1, 13 – *Mp. capsulata* Sb, 14 – *Mp. capsulata* Minsk.

Метаболизм метанола сопровождался выделением органических кислот, при этом величина pH в ходе культивирования снижался с 7,4 в начале культивирования до 4,8–5,3. При достижении этого значения pH дальнейший рост культур ингибировался. Ранее энзимологическим методом было установлено, что *Mv. menthalis* MM^T закисляет среду, образуя муравьиную кислоту (4–7 мМ) из метанола (Доронина с соавт., 2011). Образование муравьиной кислоты было обнаружено также при культивировании метанотрофов на метаноле (Ешинимаяев с соавт., 2002). Методом ВЭЖХ нами выявлено накопление 2–7 мМ муравьиной кислоты в культуральной жидкости исследуемых метиловых бактерий.

Все штаммы метиловых бактерий были ассоциированы с различными растениями, следовательно, солюбилизация ими нерастворимых фосфатов может существенно влиять на рост растений. Поскольку объектами нашего исследования служили представители различных родов метиловых бактерий, реализующих разные пути C₁-метаболизма (рибулозомонофосфатный – *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, рибулозобисфосфатный – *Delftia*, *Ancylobacter* и сериновый – *Methylopila*, *Methylobacterium*), очевидно, что фосфатсолюбилизирующая активность является характерной способностью метилотрофов. Таким образом, впервые обнаружена способность метиловых бактерий растворять трикальцийфосфат, который далее может вовлекаться в фосфорный метаболизм, как микроорганизмов, так и растений.

5.5. Синтез сидерофоров

Первоначальный скрининг для обнаружения продукции метиловыми бактериями сидерофоров проводили с использованием общепринятого теста на CAS-агаре – агаризованной минеральной среде, содержащей комплекс Fe³⁺, гексадецилтриметиламмоний бромид (HDTMA) и краситель хром-азурол S (CAS-реактив), исходная окраска которого меняется на красно-оранжевую при связывании хелатирующими агентами ионов Fe³⁺ в его составе. Рост некоторых исследуемых штаммов сопровождался появлением различных по интенсивности зон изменения цвета индикатора, что указывало на образование сидерофоров.

Для определения наличия сидерофоров в культуральной жидкости метиловых бактерий, штаммы выращивали на жидкой минеральной среде без источников железа. При смешивании бесклеточной культуральной жидкости с равным объемом реактива CAS, наблюдалось изменение окраски реактива синего цвета на оранжевый, что свидетельствовало о наличии сидерофоров у штаммов: *M. nodulans* ORS2060^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. turkensis* Side1^T, *M. extorquens* G10 (рис.34). Для точной регистрации наличия сидерофоров в культуральной жидкости изменение окраски измеряли спектрофотометрически. При этом сидерофоры были обнаружены у 11 штаммов (*Mph. flavus* Ship^T, *M. extorquens* G10 и Ps2, *M. nodulans* ORS2060^T,

Mv. mays C^T, *Mv. menthalis* MM^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. capsulata* Sb, *Mp. turkensis* Side1^T, *Delftia* sp. Lp-1, *A. sonchi* Osot^T).

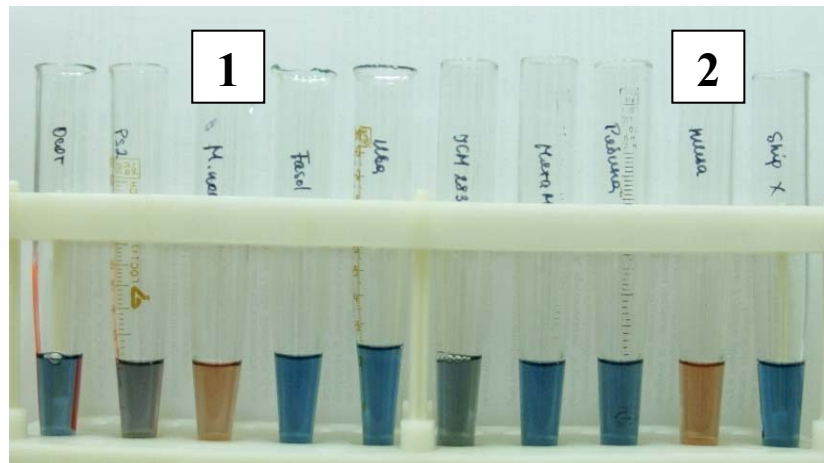


Рис. 34. Изменение окраски синего цвета CAS-реактива на оранжевый при смешивании с культуральной жидкостью, содержащей сидерофоры, штаммов *M. nodulans* ORS2060^T (1) и *Mp. musalis* MUSA^T (2)

Определение катехолового типа сидерофоров проводили, используя метод Arnow (Arnow, 1937). Изменение окраски бесклеточной культуральной жидкости на розовый (рис.35) свидетельствовало о синтезе *Mp. musalis* MUSA^T, *M. extorquens* G10, *A. sonchi* Osot^T, *Delftia* sp. Lp-1 катехолового типа сидерофоров.

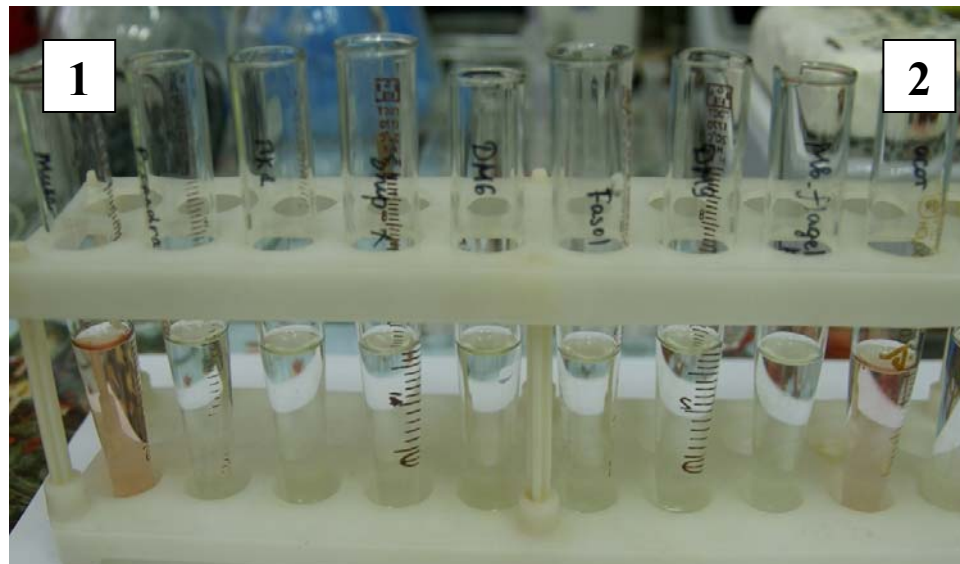


Рис. 35. Изменение окраски бесклеточной культуральной жидкости, содержащей сидерофоры катехолового типа, штаммов *Mp. musalis* MUSA^T (1) и *A. sonchi* Osot^T (2)

5.6. Антагонистическая активность

14 штаммов исследуемых метиловых бактерий различного таксономического положения (*Mp. flavus* Ship^T, *M. extorquens* штаммы G10 и Ps2, *Mb. arboreus* Iva^T, *Mv. menthalis* MM^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mv. mays* C^T, *M. nodulans* ORS2060^T, *Delftia* sp. Lp-1, *A. sonchi* Osot^T, *Mp. capsulata* штаммы Minsk и Sb, *Mp. turkensis* Side1^T, *Mv. glucosotrophus* 34) проверили на проявление антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам и грамположительным бактериям рода *Bacillus*.

В результате показано, что штамм *Delftia* sp. Lp-1, подавлял рост фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *Fusarium sporotrichum* (рис. 36). Все остальные исследуемые штаммы не проявляли антагонистическую активность по отношению к данным фитопатогенным грибам.



Рис. 36. Антагонистическая активность штамма *Delftia* sp. Lp-1 по отношению к фитопатогенным грибам. А – контроль, Б – подавление роста *Rhizoctonia solani* (1), *Fusarium sporotrichum* (2).

Кроме того, установлено, что клетки штамма *Delftia* sp. Lp-1, выращенные на среде LB, подавляли рост представителей рода *Bacillus*: *B. subtilis* subsp. *subtilis* BD170 и *B. cereus* ATCC 14579^T. Однако отмечено, что бесклеточная культуральная жидкость штамма *Delftia* sp. Lp-1, выращенного на среде LB, а также клетки, выращенные на среде “К”, не подавляли рост представителей рода *Bacillus* (рис. 37).

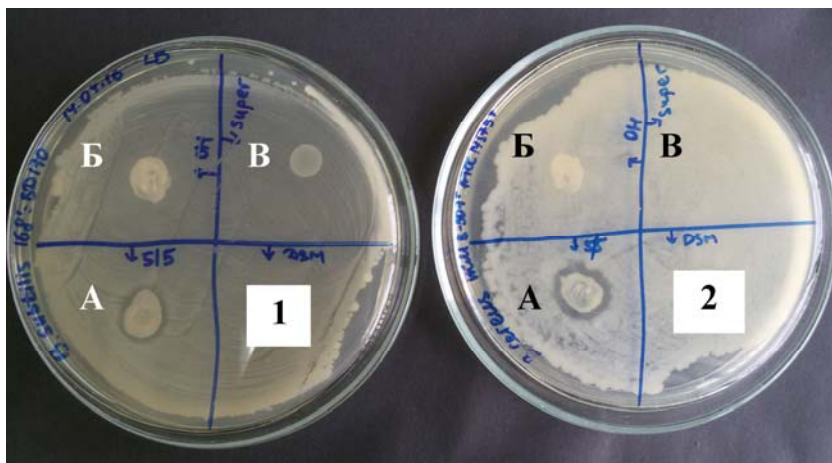


Рис. 37. Антагонистическая активность штамма *Delftia* sp. Lp-1 по отношению к грамположительным бактериям *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170 (1) и *B. cereus* ATCC 14579^T (2). А – *Delftia* sp. Lp-1, выращенные на среде LB, Б – *Delftia* sp. Lp-1, выращенные на среде “К”, В – бесклеточная культуральная жидкость *Delftia* sp. Lp-1.

Известно, что антагонизм ризосферных бактерий по отношению к фитопатогенным грибам часто обусловлен способностью микроорганизмов к синтезу антибиотиков либо других активных соединений (сидерофоры), влияющих на рост фитопатогенов. Так, бактерии рода *Pseudomonas* синтезируют феназиновые антибиотики, подавляющие рост многих фитопатогенов (Анохина, 2011). Однако у штамма *Delftia* sp. Lp-1, выделенного из ризосферы, феназиновые антибиотики не обнаружены, но выявлена способность к синтезу сидерофоров.

5.7. Исследование устойчивости растений гороха к окислительному стрессу, вызванному паракватом, при колонизации аэробными метилотрофными бактериями

Исследовано влияние колонизации гороха (*Pisum sativum* L.) аэробными метиловыми бактериями пяти различных видов (*Mph. flavus* Ship^T, *M. extorquens* G10, *Mb. arboreus* Iva^T, *Mr. musalis* MUSA^T, *Mr. turkensis* Side1^T) на устойчивость растений к стрессовым воздействиям, индуцированным гербицидом паракватом. Каждый год в окружающую среду попадает почти 3 млрд т пестицидов (Pimentel et al., 2009), из которых более трети составляют гербициды, в том числе широко применяемый гербицид паракват (Vercraene-Eairmal et al., 2010). Паракват, проникая в хлоропласты растений, перехватывает электроны от первичного акцептора электронов в фотосистеме I на свету и генерирует активные формы кислорода (АФК), инактивация которых у растений в стрессовых условиях обеспечивается многоступенчатой системой антиоксидантной защиты, в которой участвуют антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные метаболиты-антиоксиданты (Mittler, 2002).

В результате проведенных экспериментов показано, что и колонизированные, и неcolonизированные (контроль) растения оказались восприимчивы к воздействию стресса,

вызванного паракватом. Так в листьях растений в 1,5–2 раза повышалась активность супероксиддисмутазы (СОД) по сравнению с активностью СОД у необработанных им (паракватом) растений (рис. 38 а).

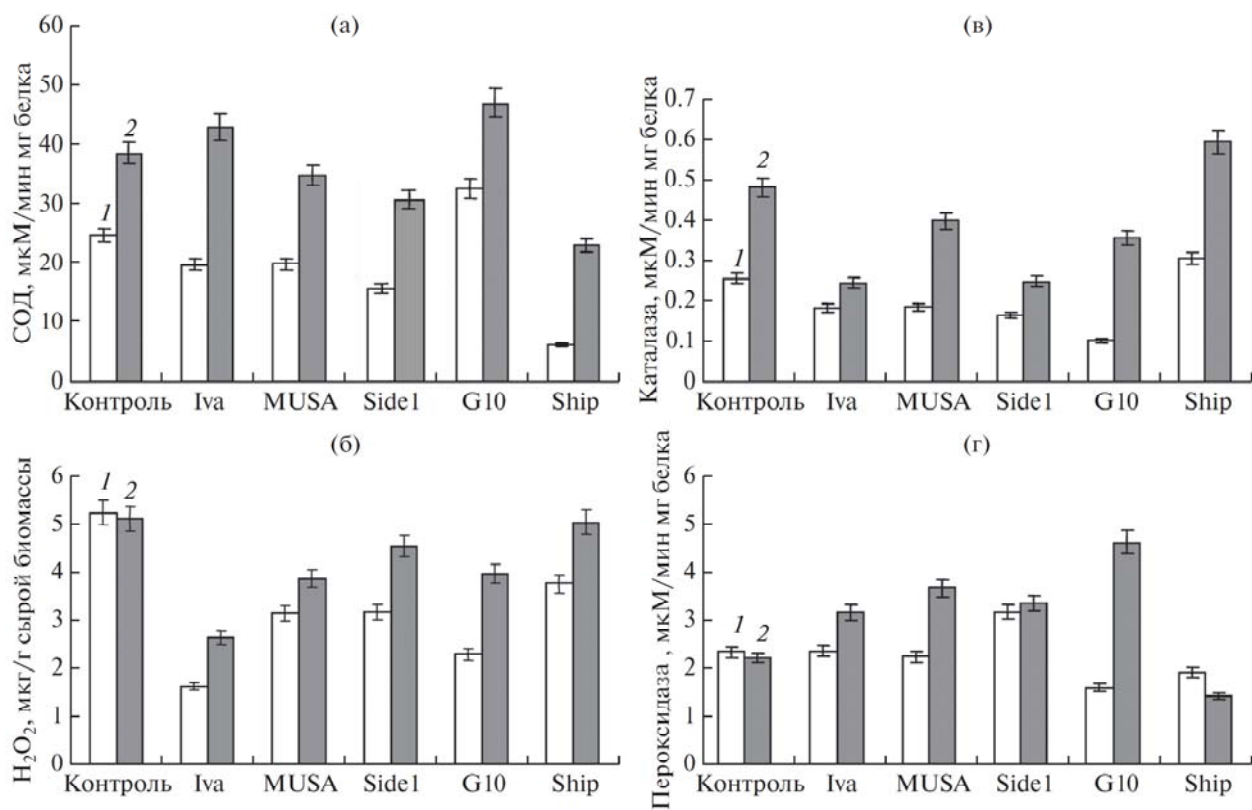


Рис. 38. Активности супероксиддисмутазы (СОД) (а), каталазы (в) и пероксидазы (г) и концентрация эндогенного H_2O_2 (б) в листьях стерильных (контроль) и колонизированных различными штаммами метиловых бактерий (*Mph. flavus* Ship^T, *M. extorquens* G10, *Mb. arboreus* Iva^T, *Mr. musalis* MUSA^T, *Mr. turkensis* Side1^T) растений гороха, выращенных в нормальных условиях (1) и после действия параквата (2).

В наибольшей степени увеличивалась активность СОД растений, колонизированных штаммом Ship^T, что, по-видимому, связано с изначально низкой концентрацией фермента в нормальных условиях (рис. 38 а). Супероксиддисмутаза является первой линией защиты от АФК и катализирует реакцию восстановления супероксидного анион-радикала до пероксида водорода. Наибольшая концентрация пероксида водорода наблюдалась у неколонизированных растений, несмотря на то, что содержание H_2O_2 у растений, инокулированных метиловыми бактериями, увеличилось в 1,3–1,7 раза (рис. 38 б). Кроме повреждающего эффекта, пероксид водорода обладает способностью контролировать активность ферментов, участвующих в передаче сигналов в клетке, поэтому повышение его концентрации могло свидетельствовать об усилении всего каскада свободнорадикальных реакций. В растениях, колонизированных штаммом G10, максимально возросли активности каталазы и пероксидазы – в 3–3,5 раза, тогда как другие инокулированные растения отреагировали на повышение концентрации перекиси водорода не так резко, активности каталазы и пероксидазы выросли в

1,5–2 раза (рис. 38 в, г). Активность каталазы в неинокулированных растениях увеличилась почти в 2 раза, активность пероксидазы оставалась на прежнем уровне, что, по-видимому, связано с эффективной работой этого фермента лишь при низких концентрациях пероксида водорода, а каталазы – при высоких его концентрациях (Пиголева с соавт., 2011). Следовательно, повышение активности ферментов, участвующих в антиоксидантной защите растений, свидетельствовало о том, что стерильные и колонизированные метиловыми бактериями растения адекватно отвечали на действие АФК, которые обладая высокой реакционной способностью, нарушали биохимические процессы в клетках растений и влияли на такие важные структуры, как клеточные мембраны.

О степени повреждения мембран при действии АФК и H_2O_2 принято судить по уровню перекисного окисления липидов (ПОЛ). Интенсивность образования малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта ПОЛ – служит маркером уровня окислительного стресса в растительной клетке (Сошинкова с соавт., 2013). Содержание МДА в листьях неколонизированного гороха и у гороха, инокулированного штаммами *Iva*^T, *MUSA*^T, *G10*, после воздействия паракватом повышалось в 1,5–1,7 раза. Также, отмечено, что после индуцированного паракватом стресса уровень МДА оставался неизменным у растений, инокулированных штаммом *Side1*^T, а снижение концентрации МДА наблюдали у гороха, колонизированного штаммом *Ship*^T (рис. 39 а).

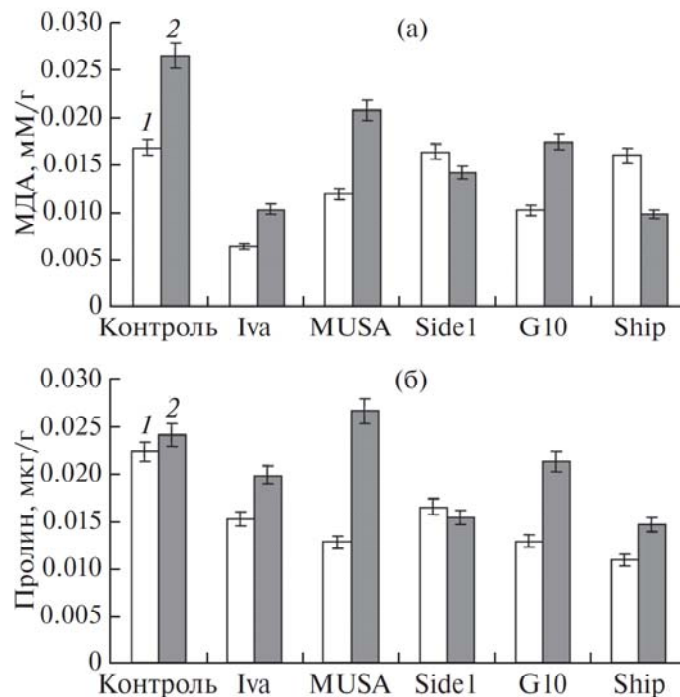


Рис. 39. Содержание малонового диальдегида (а) и пролина (б) в листьях стерильных (контроль) растений гороха и колонизированных различными штаммами метиловых бактерий в нормальных условиях (1) и после воздействия паракватом (2).

Однако, несмотря на повышение концентрации МДА в листьях растений, колонизированных штаммами Iva^T, MUSA^T, G10, уровень ПОЛ в листьях неколонизированного гороха был в 1,5-3 раза выше, чем в варианте с инокулированными растениями. Кроме того, продукты ПОЛ, образовавшиеся в ответ на действие стрессового фактора, также являются медиаторами синтеза низкомолекулярных метаболитов-антиоксидантов, снижающих повреждающее действие АФК и H₂O₂.

Низкомолекулярный метаболит-антиоксидант пролин обладает полифункциональным защитным действием при ответе на неблагоприятные изменения условий среды. Его образование приводит к нивелированию или обрыву каскада свободно-радикальных реакций, запускаемых супероксид-, пероксид- или гидроксил-радикалами. Пролин оказывает стабилизирующее действие на мембраны, уменьшает осмотический стресс, защищает белки от денатурации, участвует в передаче стрессового сигнала и может легко транспортироваться по растению, что делает его более конкурентоспособным по сравнению с ферментами антиоксидантной системы, особенно при длительном стрессе. Высокое содержание пролина наблюдают у растений, подвергнутых воздействию стрессовых факторов (Кузнецов, Шевякова, 1999). В наших экспериментах содержание пролина после стресса у растений, колонизированных метиловыми бактериями Iva^T, MUSA^T, G10, Ship^T повышалась в 1,4–1,7 раза, но при этом не превышала содержание пролина в листьях неколонизированных растений (рис. 39 б).

Судя по полученным данным, растения, колонизированные штаммом Side1^T, после обработки паракватом не испытывали значительные стрессовые воздействия, поскольку содержание МДА и пролина в их листьях практически не изменялось по сравнению с контролем. В листьях гороха, инокулированного штаммом Side1^T, было обнаружено максимальное содержание каротиноидов по сравнению со всеми остальными вариантами растений (табл. 11). Можно предположить, что отсутствие повреждающего действия активных радикалов на эти растения связано с наличием высокого содержания каротиноидов, которые наряду с пролином являются метаболитами-антиоксидантами. Одна из адаптивных физиологических реакций включает повышение содержания каротиноидов (Mittler, 2002). Каротиноиды, обладающие антенной функцией в фотосинтезе, вследствие наличия в их структуре сопряженных двойных связей связывают синглетный кислород и ингибируют образование свободных радикалов, предупреждая их негативное действие (Merzlayak, Solovchenko, 2003). Под действием параквата содержание каротиноидов в листьях неколонизированных растений увеличилось в 1,5 раза, а в листьях растений, инокулированных штаммом Side1^T – в 1,8 раза. У остальных колонизированных растений содержание каротиноидов снижалось, по-видимому, вследствие их деградации, поскольку эти пигменты

Таблица 11. Содержание и соотношение фотосинтетических пигментов у растений гороха, колонизированных разными штаммами метиловых бактерий и стерильных (контроль), в нормальных условиях (вода) и после воздействия паракватом

Вариант	ХЛ ($a+b$), мг/г		a/b		каротиноиды, мг/г		ХЛ ($a+b$)/каротиноиды	
	вода	паракват	вода	паракват	вода	паракват	вода	паракват
Контроль	0,46±0,02	0,39±0,02	1,20±0,06	1,90±0,09	0,039±0,002	0,058±0,029	11,79±0,56	6,70±0,31
Iva ^T	0,50±0,03	0,40±0,02	2,10±0,10	1,90±0,09	0,080±0,004	0,060±0,003	6,11±0,31	6,31±0,32
Musa ^T	0,68±0,03	0,23±0,01	1,80±0,09	2,17±0,10	0,080±0,004	0,037±0,002	8,36±0,41	6,20±0,31
Side1 ^T	0,50±0,03	0,67±0,03	2,17±0,10	2,50±0,12	0,061±0,003	0,107±0,005	7,77±0,38	6,23±0,30
Ship ^T	0,63±0,03	0,62±0,03	2,30±0,11	2,04±0,10	0,082±0,004	0,075±0,003	7,58±0,36	8,22±0,41
G10	0,66±0,03	0,42±0,02	1,90±0,09	2,07±0,10	0,095±0,004	0,054±0,027	6,92±0,34	7,60±0,38

являются компонентами системы антиоксидантной защиты. Истощение их запасов в результате взаимодействия с радикалами различного происхождения может быть определяющим фактором в развитии окислительного стресса.

Однако физиологическое состояние подвергнутых стрессу растений невозможно определить только по содержанию каротиноидов, т.к. важнейшими компонентами фотосинтетического аппарата растений являются хлорофиллы a и b . Содержание пигментов наиболее чувствительно к стрессовым условиям и относится к одному из основных показателей физиологического состояния растений (Шевякова с соавт., 2009). Известно, что хлорофилл a входит в состав реакционных центров и периферических антенных комплексов фотосистем I и II (ФС I и II), в то время как хлорофилл b – преимущественно компонент светособирающего комплекса ФС II (Караваев с соавт., 2001). Высокая концентрация хлорофилла характерна для здоровых растений, поскольку связана с большей эффективностью фотосинтеза. Суммарное содержание хлорофиллов в листьях неcolonизированного гороха до стресса было ниже (на 8–33%), чем у колонизированных метиловыми бактериями растений (табл. 11). Анализ содержания фотосинтетических пигментов после обработки гороха паракватом показал, что фотосистемы неcolonизированных и инокулированных растений реагировали на окислительный стресс. После воздействия паракватом содержание хлорофиллов a и b снижалось у всех растений, за исключением колонизированных штаммом Side1^T, у которых суммарное значение хлорофиллов незначительно повышалось.

Важным показателем устойчивости пигментного комплекса к стрессу является не только содержание пигментов в тканях листа, но и их соотношение. Так соотношение хлорофиллов a/b

достаточно постоянно и составляет 2,0–3,0 (Гавриленко, 2003). Постоянство отношения хлорофиллов *a* и *b* свидетельствует о неизменности стехиометрического соотношения между комплексами реакционных центров фотосистем I и II и светособирающего комплекса ФС II (Караваев с соавт., 2001). Для колонизированных метиловобактериями листьев растений, не обработанных паракватом, соотношение *a/b* варьировало в пределах нормы (1,9–2,3), что указывало на стабильность соотношения между комплексами фотосистем и сохранение оптимальных условий светосбора в ФС II. При этом соотношение хлорофиллов *a/b* в листьях неколонизированных растений в нормальных условиях было ниже, что свидетельствовало о нарушении в работе ФС I и ФС II. В стрессовых условиях соотношение хлорофиллов *a/b* у колонизированных метиловобактериями растений, варьировало незначительно и составляло 2,0–2,5. У неколонизированных растений этот показатель увеличивался с 1,2 до 1,9, что, по-видимому, было вызвано снижением содержания хлорофилла *b* при неизменном количестве хлорофилла *a*, что также свидетельствует о негативном влиянии параквата на работу ФС I и II у неколонизированных растений.

Не менее важную роль при характеристике работы фотосинтетического аппарата играет отношение суммы хлорофиллов (ХЛ) к каротиноидам (ХЛ(*a+b*)/каротиноиды). В норме это соотношение стабильно, но активно реагирует на изменения различных факторов среды. У растений, колонизированных метиловобактериями, после обработки паракватом этот показатель практически не изменялся. Напротив, после окислительного стресса у неколонизированных растений наблюдали уменьшение отношения ХЛ (*a+b*)/каротиноиды почти в 2 раза, что свидетельствовало о нарушении светособирающей функции пигментного комплекса под воздействием неблагоприятных условий.

Полученные результаты позволили предположить, что пластичность работы фотосинтетического аппарата в условиях окислительного стресса у колонизированных метиловобактериями растений гороха по сравнению с неколонизированными связана с поддержанием баланса фотосинтетических пигментов. При этом основными характеристиками являются величины соотношения хлорофиллов *a/b*, а также суммы хлорофиллов к каротиноидам. Показано, что растения, колонизированные метиловобактериями, в нормальных условиях находились в более стабильном состоянии, по сравнению с неколонизированными, о чем свидетельствовали низкие уровни активностей антиоксидантных ферментов, ПОЛ и высокая активность фотосинтетического аппарата. Все опытные растения оказались восприимчивыми к воздействию стресс-факторов, вызванных паракватом, на что указывало повышение активности антиоксидантных ферментов в листьях. Колонизация растений гороха метиловобактериями снижала негативный эффект окислительного стресса по сравнению с неколонизированными растениями, что подтверждалось низким содержанием МДА –

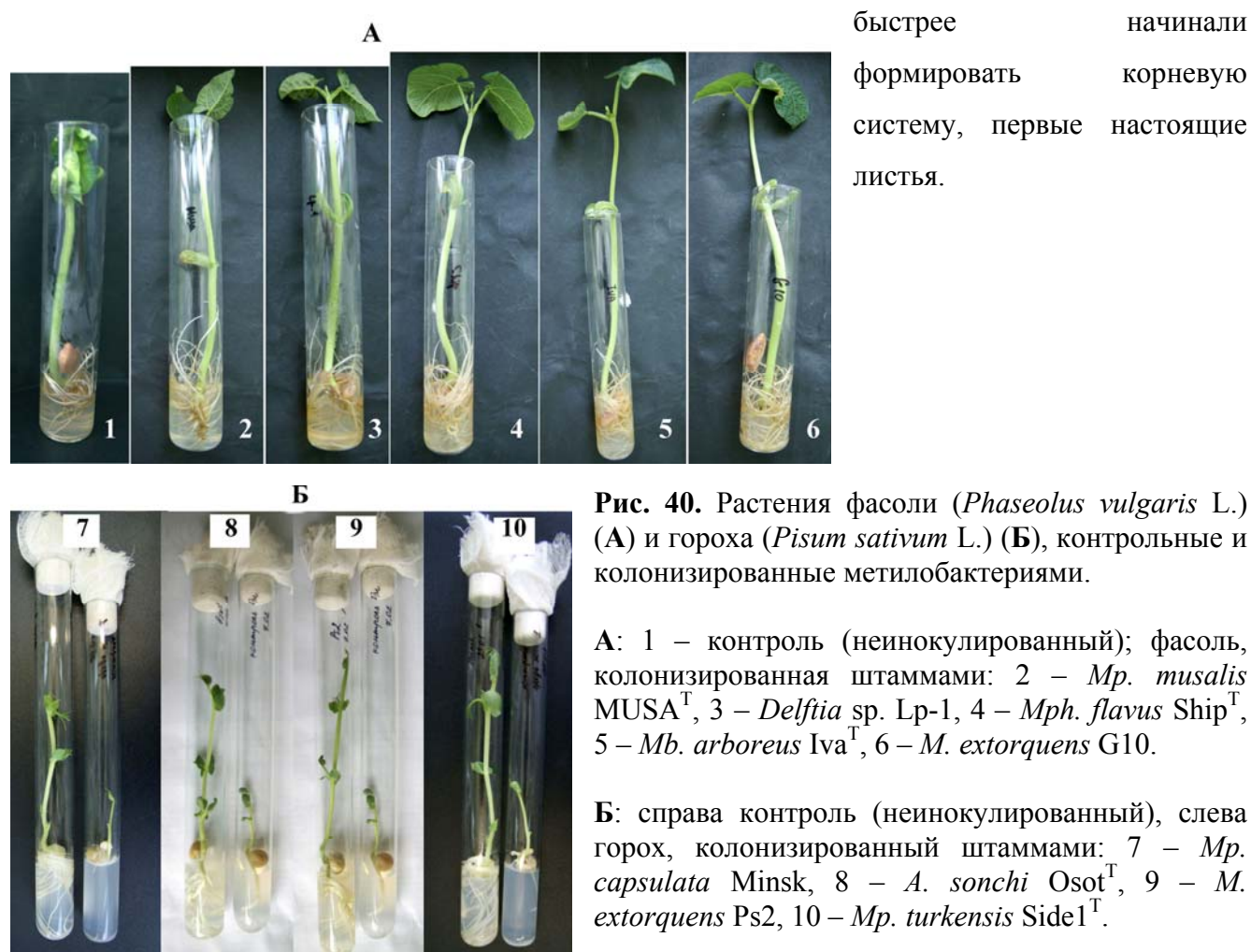
ключевого показателя повреждения клеточных мембран растений, и стабильной работой фотосинтетического аппарата. Таким образом, колонизация метиловыми бактериями существенно повышала индуцированную системную устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, вызванному гербицидом паракватом.

5.8. Влияние метиловых бактерий на рост растений

5.8.1. Влияние метиловых бактерий на рост и морфогенез растений, культивируемых *in vitro*

Простерилизованные семена растений фасоли и гороха помещали в пробирки со средой МС, инокулировали суспензией клеток исследуемых штаммов метиловых бактерий, в качестве контроля семена обрабатывали жидкой минеральной средой “К”.

После инокуляции семян фасоли на 10 сутки роста наилучший положительный эффект отмечался при колонизации 5 штаммами: *Mb. arboreus* Iva^T, *Delftia* sp. Lp-1, *Mp. musalis* MUSA^T, *M. extorquens* G10, *Mph. flavus* Ship^T (рис. 40 А). Результаты по влиянию на рост и развитие растений гороха штаммов *Mp. capsulata* Minsk, *A. sonchi* Osot^T, *M. extorquens* Ps2, *Mp. turkensis* Side1^T показаны на рис. 40 Б. Длина стебля колонизированных растений фасоли и гороха в 1,5-3 раза выше по сравнению с контролем. Кроме того, колонизированные растения



Поэтому, в аналогичных опытах, поставленных на семенах гороха, колонизированных метиловыми бактериями различного таксономического положения, наблюдали развитие растений в динамике. К 4 суткам роста разница в высоте побегов и формировании корневой системы не наблюдалась (рис. 41). Однако уже на 6 сутки ростки опытных растений заметно вытянулись, и к 10 суткам высота стебля колонизированных метиловыми бактериями растений в 2-5 раз превышала контроль, в то время как масса зеленой части была больше в 2-3 раза. Также у опытных отмечено увеличение массы корневой системы и количества боковых корней в 2-4 раза по сравнению с контролем.

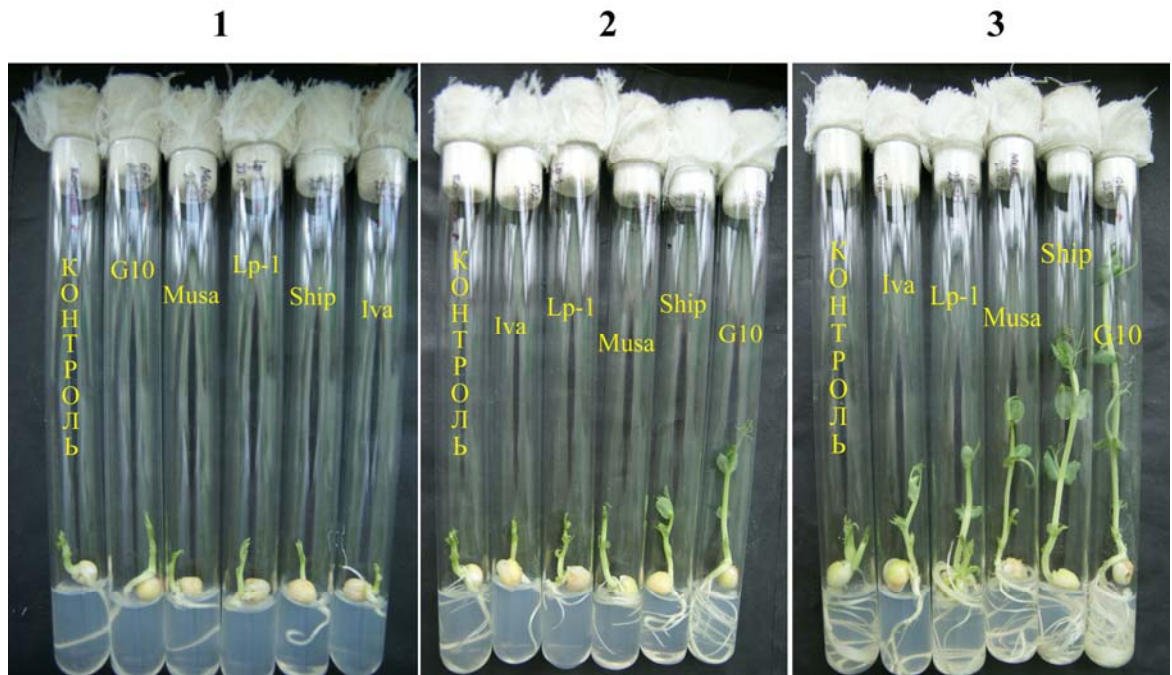


Рис. 41. Растения гороха (*Pisum sativum* L.), культивируемые *in vitro*, на 4 (1), 6 (2) и 10 (3) сутки роста, контрольные (контроль) и колонизированные штаммами метиловых бактерий (*Mb. arboreus* Iva^T, *Delftia* sp. Lp-1, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mph. flavus* Ship^T, *M. extorquens* G10)

Таким образом, колонизация исследуемыми штаммами метиловых бактерий растений фасоли и гороха стимулировала рост побегов и формирование корневой системы в условиях культивирования *in vitro*.

5.8.2. Влияние метиловых бактерий на рост и морфогенез растений, культивируемых в микровегетационных условиях

Стерильные семена огурцов (*Cucumis sativus* L.) и томатов (*Solanum lycopersicum* L.), инокулированные исследуемыми штаммами метиловых бактерий, проращивали в стерильных условиях на 0,7% водном агаре. На стадии двух семядольных листьев ростки пересаживали в пластиковые сосуды с питательным грунтом.

Влияние колонизации метиловыми бактериями на рост и морфогенез растений огурца в микровегетационных условиях. К 15 суткам роста высота колонизированных растений отличалась от контрольных в 1,5-2,0 раза, при этом первые настоящие листья появились быстрее и были заметно крупнее. Через месяц разница в длине стебля оставалась на том же уровне, при этом количество листьев на колонизированных растениях было больше. К концу эксперимента (45 суток) растения огурцов, колонизованные штаммами *Mv. glucosotrophus* 34, *A. sonchi* Osot^T, *Mp. capsulata* Sb и Minsk (рис. 42), показали значительное увеличение в высоте стебля (1,5-2,0 раза), количестве листьев (1,6-2,0 раза), длине корневой системы (1,7-2,6 раза).



Рис. 42. Влияние инокуляции различными метиловыми бактериями на рост и развитие огурца (*Cucumis sativus* L.) 1 – контроль, 2 – *Mv. glucosotrophus* 34, 3 – *A. sonchi* Osot^T, 4 – *Mp. capsulata* Sb, 5 – *Mp. capsulata* Minsk.

Таким образом, исследуемые штаммы метиловых бактерий оказывали значительное положительное влияние на рост растений *Cucumis sativus* L. в микровегетационных экспериментах в нестерильных условиях.

Влияние колонизации метиловыми бактериями на рост и морфогенез растений томата в микровегетационных условиях. Отмечено, что первые настоящие листья у колонизированных (опытных) растений появились быстрее и были крупнее, чем у неколонизированных (контроль). Через 45 сут роста после обработки ростков томата, колонизованные растения не имели существенной разницы в высоте и массе филлофферы, а также количестве листьев по сравнению с контролем. Однако инокуляция метиловыми бактериями заметно повлияла на развитие корневой системы, так как все опытные растения отличались длиной (на 15-46%) и массой (в 1,5-2 раза) корневой системы (табл. 12).

Таблица 12. Морфометрические показатели, содержание и соотношение фотосинтетических пигментов у растений томата, колонизированных штаммами метиловых бактерий и стерильных (контроль), 45 сут роста

Вариант растений	Высота стебля, см	Длина корня, см	Количество листьев	Масса зеленой части, г	Масса корней, г	УПЛП, мг/мм ²	ХЛ <i>a</i> , мг/г сырой массы	ХЛ <i>b</i> , мг/г сырой массы	Каротиноиды, мг/г сырой массы	ХЛ <i>a/b</i>
Контроль (неколонизированные)	92,0±2,5	16,0±0,8	12±1	21,9±0,9	1,01±0,05	0,17±0,01	1,65±0,08	0,70±0,04	0,28±0,01	2,35±0,21
Колонизированные штаммом: Lp-1	104,0±3,6	21,5±1,1	15±1	25,8±1,1	1,21±0,06	0,20±0,01	2,22±0,11	0,89±0,05	0,45±0,02	2,47±0,26
Fasol	85,5±2,4	23,5±1,2	11±1	19,7±1,2	2,16±0,11	0,39±0,01	2,06±0,09	0,83±0,04	0,40±0,02	2,49±0,22
Side1 ^T	87,0±4,6	18,0±0,9	12±1	20,1±1,0	1,64±0,08	0,24±0,01	2,17±0,10	0,79±0,03	0,38±0,01	2,75±0,23
G10	84,5±3,1	23,0±1,2	11±1	19,3±0,9	1,99±0,09	0,20±0,01	1,94±0,10	0,71±0,06	0,38±0,01	2,73±0,12
MUSA ^T	88,5±3,8	22,5±0,9	12±1	19,3±1,1	1,76±0,10	0,32±0,01	1,92±0,11	0,70±0,05	0,33±0,02	2,75±0,28

Наряду с этим отмечено, что после инокуляции метиловыми бактериями, опытные растения томата отличались от контрольных по внешнему виду, имели больший размер листьев с ярко-зеленой окраской, что подтверждается экспериментальными данными по содержанию фотосинтетических пигментов в листьях (хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов) и по удельной плотности листовой пластинки. Удельная плотность листовой пластинки (УПЛП) является одной из качественных характеристик структурной организации листа и представляет собой количество ассимилирующей ткани на единице площади листовой поверхности, что определяет интенсивность фотосинтеза. УПЛП колонизированных растений увеличивалась в 1,5-2,3 раза по сравнению с УПЛП контрольных растений. Кроме того, важнейшей характеристикой фотосинтетического аппарата является содержание основных фотосинтетических пигментов (хлорофилл *a*, *b* и каротиноиды) и их соотношение (ХЛ *a/b*), по уровню которых можно составить представление об эффективности ассимилирующей системы растения. Соотношения ХЛ *a/b* опытных и контрольных растений находились в пределах нормы (2,0–3,0). Колонизация метиловыми бактериями растений томата приводила к увеличению содержания в листьях фотосинтетических пигментов. По сравнению с контролем суммарное содержание хлорофиллов в листьях колонизированного томата было выше (на 10-33%), также как и уровень каротиноидов (на 20-60%). Повышение содержания фотосинтетических пигментов в листьях растений является одним из косвенных показателей эффективности фотосимбиоза и свидетельствует о положительном влиянии инокуляции растений данными штаммами.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о более интенсивной работе фотосинтетического аппарата и более высокой продуктивности растений, колонизированных метиловыми бактериями.

Диагнозы новых таксонов

Methylopila turkensis sp. nov.

Methylopila turkensis (turk.en'sis. N.L. fem. adj. – *turkensis* – новолат. прил., назван по стране источника выделения – Турции).

Грамотрицательные, неспорообразующие короткие палочки ($0,8\text{--}1,0 \times 1,0\text{--}1,5$ мкм), размножаются бинарным делением. Клетки подвижны благодаря наличию 3–5 жгутиков. Колонии на агаризованной среде “К” с метанолом точечные (1,0–2,0 мм), белые, непрозрачные, блестящие с выпуклым профилем, гладкой поверхностью, ровным краем и однородной структурой.

Растет при температуре 20–40°C и pH 6,0–9,0. Оптимум температуры для роста 29–32°C, оптимум pH 7,0. Растет при $\leq 3\%$ NaCl (оптимум 0,5–2,5%). Не нуждается в витаминах и других факторах роста. Строгий аэроб, образует каталазу, оксидазу и уреазу, имеет активность триптофандезаминазы. Активности β -галактозидазы, орнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы отсутствуют. Образует ацетоин. Синтезирует индолпроизводные, сидерофоры, солюбилизирует нерастворимые фосфаты. Желатину, эскулин, целлюлозу, казеин и крахмал не гидролизует, H₂S не образует. Не способен к нитратредукции. В качестве источников углерода и энергии использует метанол, метиламин, триметиламин, фруктозу, глицерин, этанол, малат, ацетат, сукцинат, глутамат. Метанол и метиламин окисляет соответствующими дегидрогеназами. Реализует изоцитратглиазонегативный вариант серинового пути C₁-метаболизма. Не растет на D-глюкозе, L-арабинозе, D-маннозе, D-манните, N-ацетилглюкозамине, D-мальтозе, глюконате калия, капроновой и адипиновой кислотах, цитрате натрия, фенилацетате, инозите, D-сорбите, L-рамнозе, сахарозе, D-мелибиозе, амигдалине, дихлорметане и в атмосфере метана, H₂/CO₂/O₂.

Источниками азота служат соли аммония, нитраты, метиламин и некоторые аминокислоты. В ассимиляции аммония принимают участие глутаматдегидрогеназа и глутаматный цикл (глутаматсинтаза и глутаминсинтаза).

В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{18:1 ω 7c} (76,4 %), C_{18:1 ω 7c11Me} (5,3 %), C_{18:0} (4,5 %) кислоты. В фосфолипидном профиле клеток преобладают фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Основной убихинон – Q₁₀. Содержание Г + Ц пар в ДНК составляет 65,4 мол. % (T_{пл}).

Последовательности генов 16S рПНК, *txaF* и *tauA* штамма Side1^T депонированы в GenBank под номерами KF728382, KF728383 и KF728384, соответственно. Типовой штамм *Methylopila turkensis* (ВКМ В-2748^T = DSM 27566^T) выделен из филлосферы бугенвиллии (*Bougainvillea* sp. L.), образец отобран в г. Сиде (Турция).

***Ancylobacter sonchi* sp. nov.**

Ancylobacter sonchi (son'chi. L. n. *sonchus* -i, от лат. осот, также ботаническое название рода осот; L. gen. n. *sonchi* от *Sonchus*, относящийся к *Sonchus arvensis*, из которого типовой штамм этого вида был выделен). Грамотрицательные, подвижные неспорообразующие, почти кокковидные палочки $0,4 - 0,5 \times 0,6 - 1,0$ мкм. Размножается бинарным делением. На минеральной среде с метанолом колонии белые, непрозрачные, блестящие, выпуклой формы и ровным краем, диаметр 2 мм после 3-5 сут роста при 28°C. Колонии на среде R2A после 3 дней роста при 28°C полупрозрачные, глянцевые, светло-желтые имеют выпуклую форму, диаметр 1 мм. Строгий аэроб, каталазо-, оксидазо- и уреазоположителен. Рост наблюдается при pH 6,0-9,0 и температурном диапазоне 10-30°C. Оптимальная температура 22 – 29°C, оптимум pH 7,5 – 8,0, оптимальная концентрация NaCl 0,05 % (в/об). Не растет при 0,5 % (в/об) NaCl в среде. Способен к автотрофному росту в атмосфере $H_2/O_2/CO_2$, но не на метане и дихлорометане. Не восстанавливает нитраты до нитритов. Синтезирует индолпроизводные из триптофана на среде, содержащей нитраты в качестве источника азота. Продуцирует ацетоин. Синтезирует сидерофоры катехолового типа; солюбилизирует нерастворимые фосфаты. H_2S не образует, желатину не разжижает. Не требует витаминов и других факторов роста. Факультативный метилотроф, использует метанол, метилированные амины и различные полиуглеродные соединения в качестве источника углерода и энергии. Реализует рибулозобисфосфатный путь C_1 -метаболизма.

В качестве источников азота использует соли аммония и нитраты. В ассимиляции аммония принимает участие глутаматдегидрогеназа.

В жирнокислотном составе клеток преобладают $C_{18:1 \omega 7c}$ (49,0 %), $C_{19:0 \omega 8c}$ cyclo (38,4 %) и $C_{16:0}$ (8,4 %) кислоты. В фосфолипидном профиле клеток преобладают фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин и дифосфатидилглицерин. Основной убихинон – Q_{10} . Содержание Г + Ц пар в ДНК составляет 66,1 мол. % ($T_{пл}$).

Устойчив к неомицину, налидиксовой кислоте, пенициллину, хлорамфениколу, оксациллину, линкомицину; чувствителен к ампициллину, эритромицину, гентамицину, новобиоцину, тетрациклину, стрептомицину, канамицину.

Последовательности генов 16S рРНК и *txaF* штамма Osot^T депонированы в GenBank под номерами KY492736 и KY496776, соответственно. Типовой штамм *Ancylobacter sonchi* (= VKM В-3145^T = JCM 32039^T) изолирован из корней осота полевого (*Sonchus arvensis* L.), г. Пущино, Московская область (Россия).

‘*Methylobacillus caricis*’ sp. nov.

‘*Methylobacillus caricis*’ (ca.ri.cis. M.L. n. *Carex* от лат. осока; M.L. gen. n. *caricis* от *Carex*, родовое название растения, из корней которого выделен типовой штамм этого вида). Грамотрицательные, неспорообразующие подвижные палочки (0,5-0,6×1,8-2,0 мкм), размножается бинарным делением. На минеральной среде с метанолом колонии точечные, менее 1 мм в диаметре, бесцветные с выпуклым профилем, ровным краем, однородной структурой. Строгий аэроб, образует каталазу и оксидазу. Уреаза не образует. Активности β -галактозидазы, орнитиндекарбоксилазы, лизиндекарбоксилазы отсутствуют. Оптимально растет при 22-29°C и pH 7,5-8,5 в присутствии 0,5-2% (в/об) NaCl, не растет в присутствии 3,5% (в/об) NaCl. Не растет в атмосфере H₂/O₂/CO₂, метана, на средах с пептоном, глюкозой и дрожжевым экстрактом, дихлорметане, углеводах, органических кислотах и аминокислотах. В качестве источников азота использует нитраты и аммиак. Синтезирует индолы из триптофана на среде, содержащей нитраты в качестве источников азота. Желатину не разжижает, не выделяет сероводород. Ацетоин не образует. Не нуждается в витаминах и ростовых факторах. Реализует КДФГ-вариант рибулозомонофосфатного пути C₁-метаболизма. Ферменты глиоксилатного шунта и рибулозобисфосфаткарбоксилаза отсутствуют. Аммоний ассимилирует восстановительным аминированием α -кетоглутарата.

В жирнокислотном составе клеток преобладают C_{16:0} (45,5 %), C_{16:1 ω 7c} (40,7 %) и C_{17:0} (8,0 %) кислоты. В фосфолипидном составе клеток преобладают фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Основной убихинон – Q₈. Содержание Г+Ц пар в ДНК составляет 51,4 мол. % (T_{пл}).

Устойчив к действию линкомицина, оксациллина, неомицина, пенициллина, хлорамфеникола, ампициллина. Чувствителен к гентамицину, стрептомицину, налидиксовой кислоте, тетрациклину, новобиоцину, канамицину, эритромицину.

Последовательность гена 16S рРНК штамма OV депонирована в GenBank под номером KY806199. Типовой штамм ‘*Methylobacillus caricis*’ (= VKM В-3158 = JCM 32031) изолирован из корней осоки (*Carex* sp.), г. Пущино, Московская область (Россия).

Заключение

Из различных образцов растений (г. Пущино, Московская область; г. Сиде, Турция) выделены в чистую культуру 38 штаммов аэробных метилотрофных бактерий. Показано, что наиболее распространенными среди культивируемых метиловых бактерий, ассоциированных с древесными и кустарниковыми растениями Южного Подмосковья, являются розовоокрашенные представители рода *Methylobacterium*, причем доминирует вид *Methylobacterium extorquens*. Бесцветные и желтопигментированные метилотрофные бактерии, ассоциированные с растениями, представлены различными родами: *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Hansschlegelia*, *Methylopila*, *Xanthobacter*, *Ancylobacter*, *Delftia* и *Paracoccus*. Три изолята идентифицированы как представители новых видов (*Methylopila turkensis*, *Ancylobacter sonchi*, '*Methylobacillus caricis*'). Впервые описан представитель рода *Delftia*, способный к метилотрофии. Изоляты реализуют разные пути C₁-метаболизма.

Установлено, что независимо от таксономического положения все выделенные штаммы, вероятно, способны к фитосимбиозу, поскольку используют метанол – естественный метаболит растений, и синтезируют и поставляют растениям фитогормоны – ауксины (3-50 мкг/мл). Кроме того, впервые для представителей аэробных метилотрофных бактерий (*Methylobacillus arboreus* Iva^T) показана способность к синтезу фитогормона другого класса - гибберелловой кислоты GA₃ (3,18±0,23 нг/мл культуральной жидкости).

Впервые обнаружена способность метиловых бактерий растворять минеральные фосфаты, которые далее могут вовлекаться в фосфорный метаболизм, как микроорганизмов, так и растений. Поскольку объектами нашего исследования служили представители различных родов метиловых бактерий, реализующих разные пути C₁-метаболизма (рибулозомонофосфатный – *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, рибозобисфосфатный – *Delftia*, *Ancylobacter* и сериновый – *Methylopila*, *Methylobacterium*), очевидно, что фосфатсольбилизирующая активность является характерной способностью метилотрофов.

В результате экспериментов *in vitro* выявлена антагонистическая активность штамма *Delftia* sp. Lp-1 против бактерий *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170, *B. cereus* ATCC 14579^T и фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *Fusarium sporotrichum*. В то же время у *Delftia* sp. Lp-1, выделенного из клубеньков люпина, не обнаружена способность к образованию феназиновых антибиотиков, обычно синтезируемых ризосферными псевдомонадами. Однако у *Delftia* sp. Lp-1 обнаружена способность к синтезу сидерофоров, так же как у 11 других представителей аэробных метиловых бактерий, при этом образование сидерофоров катехольного типа выявлено у *Mr. musalis* MUSA^T, *M. extorquens* G10, *A. sonchi* Osot^T, *Delftia* sp. Lp-1.

Колонизация семян фасоли, гороха, огурца и томатов аэробными метилотрофными

бактериями стимулировала рост и развитие побегов, формирование корневой системы, положительно влияла на работу фотосинтетического аппарата растений. Также показано, что колонизация метилобактериями существенно повышала адаптивную защиту и устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, так как в присутствии гербицида параквата колонизованные растения отличались более высокими активностями антиоксидантных ферментов, стабильными фотосинтетическими показателями и менее интенсивным накоплением продуктов перекисного окисления липидов, чем неколонизованные растения.

Таким образом, расширено представление о биоразнообразии аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями, обнаружены новые механизмы диалога метилобактерий с растениями – улучшение фосфорного питания, положительное влияние на рост и развитие за счет синтеза фитогормонов-гиббереллинов, повышение устойчивости к окислительному стрессу. Результаты проведенной работы создают методологические основы для разработки биопрепаратов, повышающих устойчивость к стрессам и продуктивность сельскохозяйственных культур растений.

Выводы

1. Из филлосферы и ризосферы растений выделены 38 штаммов метиловых бактерий. Филогенетический анализ показал, что доминирующими среди культивируемых метиловых бактерий в филлосфере деревьев и кустарников Южного Подмосковья являются розовоокрашенные представители рода *Methylobacterium*. Методами полифазной таксономии 3 штамма идентифицированы как представители новых видов: *Methylopila turkensis*, *Ancylobacter sonchi* и '*Methylobacillus caricis*'. Штамм Lp-1 описан, как первый представитель рода *Delftia*, способный к метилотрофии. Описанные штаммы реализуют различные пути C₁-метаболизма: *Mr. turkensis* Side1^T – сериновый, *A. sonchi* Osot^T, *Delftia* sp. Lp-1 – рибулозобисфосфатный, '*Mb. caricis*' OV – рибулозомонофосфатный.

2. Доказана способность облигатного метилотрофа *Methylobacillus arboreus* Iva^T к синтезу биоактивной гибберелловой кислоты GA₃ (3,18±0,23 нг/мл культуральной жидкости).

3. Обнаружена фосфатсольюбилизирующая активность у 14 штаммов аэробных метиловых бактерий, принадлежащих к родам *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, *Methylopila*, *Methylobacterium*, *Delftia* и *Ancylobacter*. У штамма *Delftia* sp. Lp-1 показана антагонистическая активность против бактерий рода *Bacillus* и фитопатогенных грибов родов *Rhizoctonia* и *Fusarium*.

4. Впервые выявлена способность к хелатированию ионов железа при помощи сидерофоров у представителей родов *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Methylopila*, *Ancylobacter*, при этом впервые показано образование сидерофоров катехольного типа штаммами метиловых бактерий *Methylopila musalis* MUSA^T, *Methylobacterium extorquens* G10, *Ancylobacter sonchi* Osot^T, *Delftia* sp. Lp-1.

5. Установлено, что колонизация метиловыми бактериями (*Methylophilus flavus* Ship^T, *Methylobacterium extorquens* G10, *Methylobacillus arboreus* Iva^T, *Methylopila musalis* MUSA^T, *Methylopila turkensis* Side1^T) существенно повышала адаптивную защиту и устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, вызванному обработкой гербицидом паракватом

6. Выявлена способность ряда штаммов метиловых бактерий стимулировать рост гнотобиотических растений и растений, выращенных нестерильно, что указывает на перспективность их применения в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных культур.

Список сокращений и условных обозначений

АТФ – аденозин-5'-фосфат
АФК – активные формы кислорода
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАФ - глицеральдегид-3-фосфат
ГСЛ – гомосеринлактон
ГФС – гексулозофосфатсинтаза
ДГБ – гидроксibenзоат
ДТНБ – ди-тионитробензойная кислота
ДХМ - дихлорметан
ДХФИФ – дихлорфенолиндифенол
ЖХ/МС – жидкостная хроматография/масс-спектрометрия
ИАА – индолил-3-ацетальдегид
ИАМ – индолил-3-ацетамид
ИМК – индолилмолочная кислота
ИПвК – индолилпировиноградная кислота
ИУК – индолил-3-уксусная кислота
КоА – коэнзим А
МАДГ – метиламиндегидрогеназа
МАО – метиламинооксидаза
МДА – малоновый диальдегид
МДГ – метанолдегидрогеназа
НСТ – нитросиний тетразолий
ОПР – оксипируватредуктаза
ПГБ – полигидроксibутират
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
P450 – P450-зависимая монооксигеназа
РБФ - рибулозобисфосфат
РБФК/О или **РубисКО** – рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксидаза
РМФ – рибулозомонофосфат
РОФМ – розовоокрашенных факультативные метиловобактерии
СБФ – седогептулозобисфосфат
СОД – супероксиддисмутаза
ТГМП – тетрагидрометанофтерин
ТГФ – тетрагидрофолат
ТСХ – тонкослойная хроматография
ТХУ – трихлоруксусная кислота
УПЛП – удельная плотность листовой пластинки
ФА – формальдегид
ФАДГ – формальдегиддегидрогеназа
ФБФ – фруктозо-1,6-бисфосфат
ФГИ – фосфогексулоизомераза
ФДГ – формиатдегидрогеназа
ФМС – феназинметосульфат
ХЛ – хлорофилл
ANI – от англ. “average nucleotide identity” – средняя нуклеотидная идентичность
MySH – восстановленный микотиол

Список литературы

1. Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Федоров Д.Н., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Троценко Ю.А. Новый фитосимбионт из рода *Delftia*, способный к автотрофной метилотрофии. Микробиол. 2017а. Т.86. №1. С.88-98.
2. Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.. Повышение устойчивости растений гороха к окислительному стрессу, вызванному паракватом, при колонизации аэробными метиловыми бактериями // Прикл. биохим. и микробиол. 2016. Т. 52. № 2. С. 210–216.
3. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. *Methylobacillus caricis* sp. nov. – облигатный метилотроф, выделенный из корней осоки (*Carex* sp.) // Микробиол. 2017b. Т. 86. №6.
4. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Облигатный метилотроф *Methylobacillus arboreus* Iva^T синтезирует фитогормон – гибберелловую кислоту GA₃ // Микробиол. 2018. Т. 87. №1.
5. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фосфатсолубилизирующая активность аэробных метиловых бактерий // Микробиол. 2014. Т.83. № 1. С. 28–32.
6. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. *Methylopila turkiensis* sp. nov. – новый аэробный факультативно метилотрофный фитосимбионт // Микробиол. 2015. Т.84. № 4. С. 456–465.
7. Анохина Т.О. Ризосферные плазмидосодержащие бактерии рода *Pseudomonas*, стимулирующие рост растений и деградирующие полициклические ароматические углеводороды // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Пущино. 2011. С. 146.
8. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу. М.: «Академия», 2003. 256 с.
9. Говорухина Н.И., Клестова Л.В., Цыганков Ю.Д., Троценко Ю.А., Нетрусов А.И. Характеристика нового облигатного метилотрофа // Микробиол. 1987. Т.56. № 5. С. 849-854.
10. Говорухина Н.И., Троценко Ю.А. Фосфолипидный состав метилотрофных бактерий // Микробиол. 1989. Т.58. №3. С.405-411.
11. Данилова И.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Нетрусов А.И., Рыжкова (Иордан) Е.П. Участие витамина В12 в биосинтезе ДНК у *Methylobacterium dichloromethanicum*, зависимое от интенсивности аэрации // Микробиол. 2004. Т. 73. № 1. С. 169–174.
12. Дегтева Г.К., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б. Значение хемотаксономических исследований нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной в современной

- микробиологии // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. Изд-во ННГУ, Нижний Новгород. 2001. №1. С. 8–11.
13. Доронина Н.В. Биоразнообразие и таксономия аэробных метиловых бактерий // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пушино. 1999. С. 32.
 14. Доронина Н.В., Говорухина И.И., Лысенко А.М., Троценко Ю.А. Анализ ДНК-ДНК гомологии у облигатно-метилотрофных бактерий // Микробиол. 1988. Т. 57. №4. С. 629–633.
 15. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. Метанотрофы и метиловых бактерии обнаружены в тканях древесных растений в зимний период // Микробиол. 2004. Т. 73. № 6. С. 817–824.
 16. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А. Новые данные о способности метиловых бактерий и метанотрофов синтезировать ауксины // Микробиол. 2002. Т.71, №1. С. 130–132,
 17. Доронина Н.В., Капарулина Е.Н., Троценко Ю.А. *Methylovorus menthalis* – новый вид аэробных облигатных метиловых бактерий, ассоциированных с растениями // Микробиол. 2011. Т.80. № 5 С. 700–706.
 18. Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. *Methylovorus mayi* – новый вид аэробных облигатных метиловых бактерий, ассоциированных с растениями // Микробиол. 2000. Т. 69. № 5. С. 712–716.
 19. Доронина Н.В., Ли Ц.Д., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А. *Methylophaga murata* sp. nov. – галоалкалофильный аэробный метилотроф из разрушающегося мрамора // Микробиол. 2005. Т. 74. №4. С. 511–519.
 20. Доронина Н.В., Торгонская М.Л., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А. Аэробные метиловых бактерии – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. №2. С. 111–121.
 21. Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Метаболизм метанола и глюкозы у *Anguimicrobium tetraedrale* // Микробиол. 2006. Т. № 3. С. 424–426.
 22. Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Новый термотолерантный алкалофильный метилотроф рода *Paracoccus*, ассоциированный с растениями // Микробиол. 2000. Т. 69. № 5. С. 706–711.
 23. Доронина Н.В., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А., Смолянина С.О., Беркович Ю.А. Стимуляция облигатными метилотрофными бактериями морфогенеза и антиг-рибной устойчивости китайской капусты *Brassica chinensis* L. // Биотехнология. 2009. № 6. С. 56–61.
 24. Дунайцев И.А. Выделение фосфатсольюбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Оболенск, 2010.

25. Ешинимаев Б.Ц., Хмеленина В.Н., Сахаровский В.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. Физиолого-биохимические и цитологические особенности галоалкалотолерантного метанотрофа при росте на метаноле // Микробиол. 2002. Т. 71. № 5. С. 690-700.
26. Захарченко Н. С., Пиголева С. В., Кочетков В. В., Чепурнова М. А., Дьяченко О. В., Лебедева А. А., Захарченко А. В., Пунтус И. Ф., Боронин А. М., Бурьянов Я. И. Влияние ассоциативных псевдомонад и метиловых бактерий на рост и устойчивость растений к фитопатогенам и ксенобиотикам // Физиология растений. 2012. Т.59, № 1, С.89-98.
27. Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Шепеляковская А.О., Ламан А.Г., Бровко Ф.А., Троценко Ю.А. Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты // Микробиол. 2000. Т. 69. № 6. С. 764-769.
28. Иванова Е.Г., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Образование витамина В₁₂ аэробными метилотрофными бактериями // Микробиол. 2006. Т. 75. №4. С. 570-572.
29. Каляева М.А., Захарченко Н.С., Доронина Н.В., Рукавцова Е.Б., Иванова Е.Г., Алексеева В.В., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* ассоциативными метилотрофными бактериями // Физиология растений. 2001. Т.48. №4. С.596-599.
30. Каляева М.А., Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Захарченко Н.С., Троценко Ю.А., Бурьянов Я.И. Стимуляция метанотрофными бактериями морфогенеза пшеницы *in vitro* // Доклады Академии наук. 2003. Т.388. №6. С. 847-849.
31. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Мустахимов И.И., Агафонова Н.В., Троценко Ю.А.. Биоразнообразие аэробных метиловых бактерий, ассоциированных с филлосферой растений Южного Подмосквья // Микробиология. 2017. Т. 86. №1. С.107-113.
32. Караваев В. А., Баулин А. М., Гордиенко Т. В. и др. Изменение фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 1. С. 47–54.
33. Корнилина В.В. Влияние ложного осинового трутовика (*Phellinus tremulae* Bond et Boriss) на содержание пигментов в листьях осины в лесах Ульяновской области // Фундаментальные исследования. 2012. № 9. С.668-572
34. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. 1999. Т.46. №2. С.321-336.
35. Ли Ц.Д., Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А. В₁₂-независимые изоляты *Methylophaga marina* с водорослей Красного моря // Микробиол. 2007. Т. 76. № 1. С. 88–94.
36. Логинова Н.В., Троценко Ю.А. Пути окисления и ассимиляции метилированных аминов у *Arthrobacter globiformis* // Микробиол. 1976. Т. 45. № 2. С. 217–223.

37. Максимова Н.П. Метаболизм ароматических соединений у метилотрофных бактерий // Труды Белорусского государственного университета. 2006. Т. 1. № 1. С. 13–41.
38. Максимова Н.П., Блажевич О.В., Лысак В.В., Фомичев Ю.К. Характеристика флуоресцирующего пигмента пиовердина РМ, продуцируемого бактериями *Pseudomonas putida* // Микробиол. 1994. Т. 63. Вып. 6. С. 1038 - 1044.
39. Махдавиан К., Горбанли М., Калантари Х.М. Влияние салициловой кислоты на формирование окислительного стресса, индуцированного УФ-светом в листьях перца // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 620-624.
40. Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. // М.: Мир, 1984. 264 с.
41. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 3. С. 187-207.
42. Пиголева С. В., Захарченко Н. С., Пиголев А. В., Троценко Ю. А., Бурьянов Я. И.. Влияние колонизирующих метиловых бактерий на морфогенез и устойчивость к *Erwinia carotovora* сахарной свеклы и капусты белокочанной. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 670-676.
43. Пиголева С.В., Захарченко Н.С., Ермошин А.А., Чепурнова М.А., Бурьянов Я.И. Положительное влияние колонизации сахарной свеклы метилотрофными бактериями на систему антиоксидантной защиты растений // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2011. № 3. С. 210–219.
44. Полевой В. В. Гормональная система растений. Фитогормоны. // Л.: изд-во "ЛГУ". 1982. С. 125-143.
45. Порошина М.Н., Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Троценко Ю.А. *Advenella kashmirensis* subsp. *methylica* PK1 – факультативный метилотроф из ризосферы осоки // Микробиол. 2015. Т. 84. №1. С. 90–97.
46. Романовская В.А., Соколов И.Г., Малашенко Ю.Р., Рокитко П.В. Экологические последствия радиоактивного загрязнения для почвенных бактерий в десятикилометровой зоне ЧАЭС // Микробиол. 1998. Т. 67. № 1. С. 106–115.
47. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.П. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины // Мікробіол. журн. 1996. Т. 58. № 3. С. 3–10.
48. Смирнова Л.П., Кондакова И.В.. Зависимость активности антиоксидантных ферментов от выраженности процессов пролиферации и типа тканевой организации карциномы эрлиха // Биомедицинская химия. 2004. Т.50. С. 566-575.

49. Соколов А.П., Троценко Ю.А. Циклический путь окисления формальдегида у *Pseudomonas oleovorans* // Микробиол. 1977. Т. 46. №6. С. 1119–1121.
50. Сошинкова Т. Н., Радюкина Н. Л., Д. В. Королькова, Носов А. В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Theilungiella salsuginea* при окислительном стрессе // Физиология растений. 2013. Т.60, №1. С.47-60.
51. Темиров Ю.В., Есикова Т.З., Кашпаров И.А., Балашова Т.А., Винокуров Л.М., Алахов Ю.Б. Катехольный сидерофор, продуцируемый терморезистентным штаммом *Bacillus licheniformis* VK21 // Биоорганическая химия. 2003. №6. С. 597-604
52. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии / Под. ред. В.Ф. Гальченко. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. С. 222–224.
53. Троценко Ю.А., Иванова Е.Г., Доронина Н.В. Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты // Микробиол. 2001. Т. 70, №6. С.725-736.
54. Федоров Д.Н., Бут С.Ю., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Влияние экзогенной индолилуксусной кислоты на активность ферментов центрального метаболизма у *Methylobacterium extorquens* AM1 // Микробиол. 2009. Т. 78. № 6. С. 844–846.
55. Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. клонирование и характеристика индолил-3-пируватдекарбоксилазы из *Methylobacterium extorquens* AM1 // Биохимия. 2010. Т. 75. № 12. С. 1651–1661.
56. Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных метиловобактерий: новые факты и гипотезы // Микробиол. 2011. Т. 80. № 4. С. 435–446.
57. Федоров Д.Н., Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Новая система вырожденных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации *nifHD* генов // Микробиол. 2008. Т. 77. № 2. С. 286–288.
58. Цавкелова, Е.А., Климова, С.Ю., Чердынцев, Т.А. и др. Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. №3. С. 261–268.
59. Шевякова Н.И., Бакулина Е.А., Кузнецов Вл.В. Антиоксидантная роль пролина у галофита хрустальной травки при действии засоления и параквата, инициирующих окислительный стресс // Физиология растений. 2009, Т.56. №5. С. 736-742.
60. Шепеляковская А.О., Доронина Н.В., Ламан А.Г., Бровко Ф.А., Троценко Ю.А. Новые данные о способности аэробных метилотрофных бактерий синтезировать цитокинины // Докл. РАН. 1999. Т. 368. № 4. С. 555–557.
61. Achard P., Renou J.-P., Berthome R. Harberd N.P., Genschik P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species // Curr. Biol. 2008. V. 18. P.656–660.

62. Agafonova N.V., Kaparullina E.N., Doronina N.V., Trotsenko Yu.A. *Ancylobacter sonchi* sp. nov., a novel methylotrophic bacterium from roots of *Sonchus arvensis* L. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. DOI: 10.1099/ijsem.0.002330
63. Ahmed E., Holmstrom J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications // Microb. Biotech. 2014. V. 7. №3. P. 196–208.
64. Alonso R., Martin A., Pelaez T., Marin M., Rodríguez-Creixems M., Bouza E. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile* // J. Med. Microbiol. 2005. V. 54. № 2. P. 155-157.
65. Andreote F. D., Lacava P. T., Gai C. S. Araujo, Maccheroni W.L., Overbeek W. Jr., van Elsas L.S., J.D. van Azevedo, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa* // Can. J. Microbiol. 2006. V. 52. № 5. P. 419–426.
66. Andreote F. D., Carneiro R. T., Salles J. F., Marcon J., Labate C. A., Azevedo J. L., W. L. Araújo. Cultureindependent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus // Microbial. Ecology. 2009. V. 57, № 1. P. 82–93.
67. Anthony C., Zatman L.J. The microbial oxidation of methanol. The methanol-oxidizing enzyme of *Pseudomonas* sp. M27 // Biochem. J. 1964. V. 92. P. 614–621.
68. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs // London: Acad. Press, 1982. 251p.
69. Anthony C. Bacterial oxidation of methane and methanol // Adv. Microb. Physiol. 1986. V. 27. P. 113–210.
70. Ara'ujo W. L., Marcon J., Maccheroni W. Jr., van Elsas J.D., van Vuurde J. W. L., Azevedo J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. №10. P. 4906–4914.
71. Ardanov P., Sessitsch A., Haeggman H., Kozyrovska N., Pirttilae A.M. *Methylobacterium*-Induced Endophyte Community Changes Correspond with Protection of Plants against Pathogen Attack // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. P. e46802.
72. Ardanov P., Lyastchenko S., Karppinen K., Häggman Hel., Kozyrovska N., Pirttilä A. M. Effects of *Methylobacterium* sp. on emergence, yield, and disease prevalence in three cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) were associated with the shift in endophytic microbial community // Plant Soil. 2016. V. 405 (1). P. 299–310.
73. Arnow L.E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures // J. Biol. Chem. 1937. V.118. P.531-537.
74. Arshad M., Frankenberger W.T. Jr. Ethylene: Agricultural sources and applications // Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2002. P. 450.

75. Baker J. C., Crumley R. E., Eckdahl T. T. Random Amplified Polymorphic DNA PCR in the Microbiology // Biochem. Mol. Biol. Education. 2002. V. 30. № 6. P. 394–397.
76. Balachandar D., Raja P., Sundaram S.P. Genetic and metabolic diversity of pink-pigmented facultative methylotrophs in phyllosphere of tropical plants // Braz. J. Microbiol. 2008. V. 39. P. 68–73.
77. Bastian F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Baraldi R., Bottini R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media // Plant Growth Regulation. 1998. V. 24. P. 7–11.
78. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39. P. 205–207.
79. Beck D.A.C., McTaggart T.L., Setboonsarng U., Vorobev A., Kalyuzhnaya M.G., Ivanova N., Goodwin L., Woyke T., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. Ed. by M.R. Mormile. The expanded diversity of *Methylophilaceae* from Lake Washington through cultivation and genomic sequencing of novel ecotypes // PLoS One. 2014. V. 9. doi: 10.1371/journal.pone.0102458.
80. Beers R.E., Sizer J.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // J. Biol. Chem. 1952. V. 195. P. 133–140.
81. Blackmore M.A., Quayle J.R. Microbial growth on oxalate by a route not involving glyoxylate carboligase // Biochem. J. 1970. V. 118. P. 53–59.
82. Boiero L., Perrig D., Masciarelli O., Penna C., Cassón F., Luna V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 874–880.
83. Borodina E., Kelly D.P., Schumann P., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L., Wood A.P. Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. // Arch. Microbiol. 2002. V. 177. P. 173–183.
84. Bottini R, Cassan F, Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 65. P. 497–503.
85. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
86. Braud A., Jézéquel K., Bazot S., Lebeau T. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria // Chemosphere. 2009. V. 74. P. 280–286.
87. Butler J.H. Better budgets for methyl halides? // Nature. 2000. V. 403. P. 260–261.
88. Camilli A., Bassler B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways // Science. 2006. V. 311. № 5764. P. 1113–1116.

89. Carls R.A., Hanson R.S. Isolation and characterization of tricarboxylic acid cycle mutants of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1971. V. 106. P. 848–855.
90. Cassán F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 2053–2058.
91. Chistoserdova L., Vorholt J.A., Thauer R.K., Lidstrom M.E. C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea // Science. 1998. V. 281. P. 99–102.
92. Chistoserdova L., Chen S.W., Lapidus A., Lidstrom M.E. Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 2980–2987.
93. Chistoserdova L., Crowther G.J., Vorholt J.A., Skovran E., Portais J.C., Lidstrom M.E. Identification of a fourth formate dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1 and confirmation of the essential role of formate oxidation in methylotrophy // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 9076–9081.
94. Chistoserdova L., Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E. The expanding world of methylotrophic metabolism // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 477–499.
95. Collins M.D. Analysis of isoprenoid quinines // Method. Microbiol. Ed. Gottschalk G. N.Y.: Acad. Press., 1985. V. 18. P. 329–366.
96. Cornelis P., Andrews S.C. Iron uptake and homeostasis in microorganisms // Caister Academic Press, Norfolk, UK. P. 1-85.
97. Corpe W.A., Rheem S. Ecology of the methylotrophic bacteria living on leaf surface // FEMS Microbiol. Ecol. 1989. V. 62. P. 243–250.
98. Costa H., Gallego S. M., Tomaro M.L.. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons // Plant Science. V.162. 2002. P. 939-945.
99. Costacurta A., Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria // Crit. Rev. Microbiol. 1995. V. 21. P. 1–18.
100. Da Costa M.S., Albuquerque L., Nobre M.F., Wait R. The Identification of fatty acids in bacteria // Method Microbiol. 2011. V. 38. P. 183–196. doi 10.1016/B978-0-12-387730-7.00008-5.
101. De Ley J., Cattoir H., Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates // Eur. J. Biochem. 1970. V. 12. P. 133–142.
102. Dedysh S.N., Smirnova K.V., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Liesack W., Trotsenko Y.A. Methylotrophic autotrophy in *Beijerinckia mobilis* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. P. 3884–3888.
103. Delmotte N., Knief C., Chaffron S., Innerebner G., Roschitzki B., Schlappbach R., von Mering C., Vorholt J.A. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009. V. 106. P. 16428–16433.

104. Deyhle R.R., Barton L.L. Nicotinamide adeninedinucleotide – independent formate dehydrogenase in *Mycobacterium phlei* // Can. J. Microbiol. 1977. V. 23. P. 125-130.
105. Dixon G.H., Kornberg H.L. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle // Proceedings of the biochemical society. 1959. P. 3.
106. Doronina N.V., Braus-Strohmeyer S.A., Leisinger T., Trotsenko Y.A. Isolation and characterization of a new facultatively methylotrophic bacterium: description of *Methylorhabdus multivorans* gen. nov., sp. nov. // Syst. Appl. Microbiol. 1995. V. 18. P. 92–98.
107. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Krausova V.I., Boulygina E.S., Tourova T.P. *Methylopila capsulata* gen. nov., sp. nov., a novel non-pigmented aerobic facultatively methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Bacteriol. 1998. V. 48. P. 1313–1321.
108. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P. *Methylarcula marina* gen. nov., sp. nov. and *Methylarcula terricola* sp. nov.: novel aerobic, moderately halophilic, facultatively methylotrophic bacteria from coastal saline environments // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1849–1859.
109. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Leisinger T. *Albibacter methylovorans* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic, facultatively autotrophic and methylotrophic bacterium that utilizes dichloromethane // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 1051–1058.
110. Doronina N.V., Trotsenko Y.A. Reclassification of '*Blastobacter viscosus*' 7d and '*Blastobacter aminooxidans*' 14a as *Xanthobacter viscosus* sp. nov. and *Xanthobacter aminooxidans* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003a. V. 53. P. 179–182.
111. Doronina N.V., Darmaeva T.D., Trotsenko Y.A. *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alcaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikalian Region // Syst. Appl. Microbiol. 2003b. V. 26. P. 382–389.
112. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Kolganova T.V., Tourova T.P., Salkinoja-Salonen M.S. *Methylobacillus pratensis* sp. nov., a novel non-pigmented, aerobic, obligately methylotrophic bacterium isolated from meadow grass // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 1453-1457.
113. Doronina N.V., Gogleva A.A., Trotsenko Y.A. *Methylophilus glucosoxydans* sp. nov., a restricted facultative methylotroph from rice rhizosphere // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 196-201.
114. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Bykova T.V., Trotsenko Y.A. *Methylopila musalis* sp. nov., an aerobic, facultatively methylotrophic bacterium isolated from banana fruit // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013a. V. 63. P. 1847-1852.
115. Doronina N.V., Poroshina M.N., Kaparullina E.N., Ezhov V.A., Trotsenko Yu.A. *Methyloligella halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Methyloligella solikamskensis* sp. nov., two non-pigmented halotolerant obligately methylotrophic bacteria isolated from the Ural saline environments // Syst. Appl. Microbiol. 2013b. V. 36. P. 148–154.

116. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A. The family *Methylophilaceae* / In: The Prokaryotes. Eds.: E. Rosenberg, DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. // Berlin-Heidelberg: Springer Verlag. 2014. P. 869-880.
117. Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat // *Acta Physiol. Plant.* 2009. V. 31. P. 861–864.
118. Egorov A.M., Avilova T.V., Dikov M.M., Popov V.O., Rodionov Y.V., Berezin I.V. NAD⁺-dependent formate dehydrogenase from methylotrophic bacterium strain 1. Purification and characterization // *Eur. J. Biochem.* 1979. V. 99. P. 569–576.
119. Elliot W.H., Kaplan N.O. In: *Methods in Enzymol* / Eds. Colowick S.P., Kaplan N.O. N.Y.: Acad. Press., 1955. V. 11. P. 337.
120. Emanuele J.J., Heasley C.J., Fitzpatrick P.F. Purification and characterization of the flavoprotein tryptophan 2-monooxygenase expressed at high levels in *Escherichia coli* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 316. P. 241–248.
121. Erb T.J., Berg I.A., Brecht V., Muller M., Fuchs G., Alber B.E. Synthesis of C₅-dicarboxylic acids from C₂-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: The ethylmalonyl-CoA pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 10631–10636.
122. Facchini P.J., Huber-Allanach K.L. Tari L.W. Plant aromatic L-aminoacid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications // *Phytochemistry.* 2000. V. 54. P. 121–138.
123. Fahad S., Hussain S., Bano A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F.A., Khan F., Chen Y.T., Wu C., Tabassum M.A., Chun M.X., Afzal M., Jan A., Jan M.T., Huang J.L., Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. V. 22. P. 4907–4921.
124. Fahad S., Hussain S., Matloob A., Khan F.A., Khaliq A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F., Ullah N., Faiq M., Khan M.R., Tareen A.K., Khan A., Ullah A., Ullah N., Huang J.L. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review // *Plant Growth Regul.* 2015. V. 75. P. 391–404.
125. Falkowska M., Pietryczuk A., Piotrowska A., Czerpak R., Bajguz A., Grygoruk A., Czerpak R. The effect of gibberellic acid (GA₃) on growth, metal biosorption and metabolism of the green algae *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyceae*) Beijerinck exposed to cadmium and lead stress // *Polish J. Environ. Stud.* 2011. V. 20. P. 53-59.
126. Fall R. Cycling of methanol between plants, methylotrophs and the atmosphere // *Microbial growth on C₁-compounds* / Eds.: M.E. Lidstrom, F.R. Tabita. Dordrecht:Kluwer Acad. Publ. 1996. P. 343–350.

127. Fedorov D.N., Ekimova G.A., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC // FEMS Microbiol. Lett. 2013. V. 343. № 1. P. 70–76.
128. Ferenci T., Strom T., Quayle J.R. Purification and properties of 3-hexulose phosphate synthase and phospho-3-hexuloisomerase from *Methylococcus capsulatus* // Biochem. J. 1974. V. 144. P. 477–486.
129. Fett W. F., Osman S. F., Dunn M. F. Auxin production by plant-pathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 8. P. 1839–1845.
130. Firsova J., Doronina N., Lang E., Spröer C., Vuilleumier S., Trotsenko Y. *Ancylobacter dichloromethanicus* sp. nov. – a new aerobic facultatively methylotrophic bacterium utilizing dichloromethane // Syst. Appl. Microbiol. 2009. V. 32. P. 227–232.
131. Frenkel C., Peters J.S., Tieman D.M., Tiznado M.E., Handa A.K. Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 4293–4295.
132. Fuerst P.E., Nakatani H.Y., Dodge A.D., Penner D., Arntzen C.J. Paraquat resistance in conyza // Plant Phisiol. 1985. V. 77. № 4. P. 984–989.
133. Galbally I.E., Kirstine W. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol // J. Atmospheric Chemistry. 2002. V. 43. P. 195–229.
134. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. 2010. V. 48. P. 909–930.
135. Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J. McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // Crit. Rev. Plant Sci. 2007. V. 26. P. 227–242.
136. Goenrich M., Bartoschek S., Hagemeyer C.H., Griesinger C., Vorholt J.A. A glutathione-dependent formaldehyde – activating enzyme (Gfa) from *Paracoccus denitrificans* detected and purified via 2D proton exchange NMR spectroscopy // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 3069–3072.
137. Gogleva A.A., Kaparullina E.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. *Methylophilus flavus* sp. nov., and *Methylophilus luteus* sp. nov., aerobic, methylotrophic bacteria associated with plants // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2623–2628.
138. Gogleva A.A., Kaparullina E.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. *Methylobacillus arboreus* sp. nov., and *Methylobacillus gramineus* sp. nov., novel non-pigmented obligately methylotrophic bacteria associated with plants // Syst. Appl. Microbiol. 2011. V. 34. P. 477–481.
139. Goldstein A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects // Am. J. Altern. Agri. 1986. V.1. P. 51–57.
140. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. 1951. V. 26. P. 192–195.

141. Goris J. Konstantinidis K. T., Klappenbach J. A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J. M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 81–91. doi: 10.1099/ijs.0.64483-0.
142. Gottig N., Garavaglia B.S., Garofalo C.G., Orellano E.G., Ottado J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for Citrus Canker, is involved in bacterial virulence // *PLoS One*. 2009. V. 4. P. e4358–4358.
143. Govorukhina N.I., Trotsenko Y.A. *Methylovorus*, a new genus of restricted facultatively methylotrophic bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991. V. 41. P. 158–162.
144. Greenberg D.E., Porcella S.F., Stock F., Wong A., Conville P.S., Murray P.R., Holland S.M., Zelazny A.M. *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006. V. 56. P. 2609–2616.
145. Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F. R., Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins // *Physiol. Plant.* 2001. V. 111. P. 206 – 211.
146. Hanson A.D., Roje S. One-carbon metabolism in higher plants // *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 119–137.
147. Holland M.A. *Methylobacterium* and plants // *Recent Res. Devel. Plant Physiol.* 1997. V. 1. P. 207–213.
148. Holmes A.S., Kelly D.P., Baker S.C., Thomson A.S., De Marco P., Kenna E.M., Murrell J.C. *Methylosulfonomonas methylovora* gen. nov., sp. nov., and *Marinosulfonomonas methylotropa* gen. nov., sp. nov.: novel methylotrophs able to grow on methanesulfonic acid // *Arch. Microbiol.* 1997. V. 167. P. 46–53.
149. Honma M., Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // *Agric. Biol. Chem.* 1978. V. 42. P. 1825–1831.
150. Hopner J., Trautwein A. *Pseudomonas oxalaticus*: requirement of a cosubstrate for growth on formate // *Biochem. J.* 1971. V. 155. P. 234–245.
151. Horneffer V., Haverkamp J., Janssen H.G., Steeg P.F., Notz R. MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: wet heat-treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling // *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2004. V. 15. P. 1444–1454.
152. Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Ya. Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria // *Microorganisms.* 2015. V. 3. P. 137–151.
153. Ikeda S., Okubo T., Anda M., Nakashita H., Yasuda M., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Eda S., Momiyama A., Terasawa K., Mitsui H., Minamisawa K. Community and genome-based views of

- plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 1398–1410.
154. Indiragandhi P., Anandham R., Kim K., Yim W., Madhaiyan M., Sa T. Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium oryzae* CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase // *World J. Microb. Biot.* 2008. V. 24. № 7. P. 1037–1045
155. Iqbal N., Umar S., Khan N.A., Khan M.I.R. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism // *Environ. Exp. Bot.* 2014. V. 100. P. 34–42.
156. Islam F., Ali T. Y. Q., Ali Sh., Arif M. S., Hussain S., Rizvi H. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. // *Ecotoxic. Environ. Safety.* V. 104. 2014, P. 285–293.
157. Ivanova E.G., Doronina N.V., Trotsenko Yu. A. *Hansschlegelia plantiphila* gen. nov. sp. nov., a new aerobic restricted facultative methylotrophic bacterium associated with plants // *Syst. Appl. Microbiol.* 2007. V. 30. P. 444–452.
158. Jambor J.L., Dutrizac J.E. Occurrence and constitution of natural and synthetic ferrihydrite, a widespread iron oxyhydroxide // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 2549–2586/
159. Javid M.G., Sorooshzadeh A., Moradi F., Sanavy S.A.M.M., Allahdadi I. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants // *Aust. J. Crop. Sci.* 2011. V. 5. P. 726–734.
160. Jay P.V., Janardan Y., Kavindra N.T., Ashok K. Effect of indigenous Mesorhizobium spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture // *Ecol. Eng.* 2013. V. 51. P. 282–286.
161. Jayashree S., Vadivukkarasi P., Anand K., Kato Y., and Seshadri S. Evaluation of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria for phosphate solubilization // *Archives of Microbiology.* 2011. V. 193. № 8. P. 543–552.
162. Jenkins O., Byrom D., Jones D. *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987. V. 37. P. 446–448.
163. Jiang M., Zhang J. Water stress-induced phorbic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize-leaves // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 2401–2410.
164. Johnson P.A., Quayle J.R. Microbial growth on C₁-compounds. Oxidation of methanol, formaldehyde and formate by methanol-grown *Pseudomonas* AM1 // *Biochem. J.* 1964. V. 93. P. 281–290.
165. Johnstone T.C., Nolan E.M. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores // *Dalton Trans.* 2015. V. 44. № 3. P. 6320–6339.

166. Jourand P., Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B., De Lajudi E. P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 2269-2273.
167. Kakimoto T. Biosynthesis of cytokinins // J. Plant Res. 2003. V. 116. P. 233–239.
168. Kalyuzhnaya M.G., De Marco P., Bowerman S., Pacheco C.C., Lara J.C., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. *Methyloversatilis universalis* gen. nov., sp. nov., a novel tax-on within the *Betaproteobacteria* represented by three methylotrophic isolates // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2517–2522.
169. Kalyuzhnaya M.G., Hristova K.R., Lidstrom M.E., Chistoserdova L: Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution // J. Bacteriol. 2008. V. 190. P. 3817-3823.
170. Kalyuzhnaya M.G., Beck D.A.C., Vorobev A., Smalley N., Kunkel D.D., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. Novel methylotrophic isolates from lake sediment, description of *Methyloversatilis* sp. nov. and emended description of the genus *Methyloversatilis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 106–111.
171. Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov., a novel non-pigmented obligately methylotrophic bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 425-431.
172. Kato N., Yurimoto H., Thauer R.K: The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006. V. 70. P. 10-21.
173. Kawaguchi M., Fujioka S., Sakurai A., Yamaki Y. T. R., Syono K. Presence of a pathway for the biosynthesis of auxin via indole-3-acetamide in trifoliata orange // Plant Cell Physiol. 1993. V. 34. P. 121–128.
174. Keppler F., Hamilton J.T.G., Brass M., Roeckmann T. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions // Nature. 2006. V. 439. P. 187–191.
175. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review // Agron Sustain. 2007. V. 27(1). P. 29–43.
176. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils // Environ. Chem. Lett. 2009. V. 7. P. 1–19.
177. Kiefer P., Portais J.C., Vorholt J.A. Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry // Anal. Biochem. 2008. V. 382. P. 94–100.

178. Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 346–351.
179. Knief C., Ramette A., Frances L., Alonso-Blanco C., Vorholt J.A. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere // *ISME J.* 2010. V. 4. P. 719–728.
180. Koenig R.L., Morris R.O., Polacco J.C. tRNA is the source of low-level *trans*-zeatin production in *Methylobacterium* spp. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1832–1842.
181. Koga J., Adachi T., Hidaka H. IAA biosynthesis pathway from tryptophan via indole-3-pyruvic acid in *Enterobacter cloacae* // *Agric. Biol. Chem.* 1991. V. 55. P. 701–706.
182. Kolb S. Aerobic methanol-oxidising Bacteria in soil // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. V. 300. P. 1–10.
183. Kornberg A., Horecker B.L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: *Methods in Enzymol.* 1955. V. 1. P. 323.
184. Krog A., Heggset T.M.B., Müller J.E.N., Kupper C.E., Schneider O., Vorholt J.A., Ellingsen T.E., Brautaset T. Methylophilic *Bacillus methanolicus* encodes two chromosomal and one plasmid born NAD⁺ dependent methanol dehydrogenase paralogs with different catalytic and biochemical properties // *PLoS ONE* 2013. V. 8 (3). P. e59188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059188>
185. Kumaran S., Elango R. Production of indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA) by *Azospirillum brasilense* under temperature and salt stress condition // *Int. J. Curr. Life Sci.* 2013. V. 3. P. 356–359.
186. Kurosawa E. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the ‘bakanae’ fungus // *Nat. Hist. Soc. Formosa.* 1926. V. 16. P. 213–227.
187. Kwak M.J., Jeong H., Madhaiyan M., Lee Y., Sa T.M., Oh T.K., Kim J.F. Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere // *PLoS ONE.* 2014. V. 9. P. e106704.
188. Lacava P.T., Silva Stenico M.E., Araújo W.L., Simionato A.V.C., Carrilho E., Tsai S.M., Azevedo J.L. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium* spp. associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* // *Pesq. Agropec. Bras.* 2008. V. 43. № 4. P. 521–528.
189. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Eds.: Stackebrandt E., Goodfellow M. Chichester: John Wiley and Sons. 1991. P. 115–175.
190. Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P., Ruan J.S. Two new genera of nocardio-form actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. P. 29–37.

191. Lee K.H., Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kang B.-G., Lee Y.-J., Chung J.-B., Sa T.-M. Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice // Plant Soil. 2010. V. 328. P. 71–82.
192. Lehmann K.B., Neumann R. Atlas und grundriss der bakteriologie und lehrbuch der speciellen bakteriologischen diagnostik, 1st ed., J.F. Lehmann, München, 1896.
193. Lidstrom M.E., Stirling D. Methylotrophs: genetics and commercial applications // Ann. Rev. Microbiol. 1990. V. 44. P. 27–58.
194. Long R., Morris R., Polacco J. Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria // The Amer. Soc. Plant Physiol. 1997. Abstr. № 1168.
195. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
196. Lugtenberg B., Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 541–556.
197. Ma Y., Rajkumar M., Vicente J., Freitas H. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops // Int. J. Phytoremediat. 2010. V. 13. P. 126–139.
198. MacMillan J., Suter P.J. The occurrence of gibberellin A₁ in higher plants-isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*) // Naturwissenschaften. 1958. V. 45. P. 46. doi: 10.1007/BF00635028.
199. MacMillan J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria // J. Plant Growth Regul. 2002. V. 20. P. 387–442.
200. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Seshadri S., Chung H., Yang J., Sundaram S., Sa T. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. // Bot. Bull. Acad. Sin. 2004. V. 45. № 2. P. 315–324.
201. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sundaram S., Sa T. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) // Environ. Exp. Bot. 2006a. V. 57. P. 168–176.
202. Madhaiyan M., Suresh Reddy B.V., Anandham R., Senthikumar M., Poonguzhali S., Sundaram S., Sa T. Plant growth promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens // Curr. Microbiol. 2006b. V. 53. P. 270–276.
203. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Lee J.-S., Lee K.-C. *Methylobacterium gossipiicola* sp. nov., a pink pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the cotton phyllosphere // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. № 1. P. 162–167.

204. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Pragatheswari D., Lee K.-C., Lee J.-S. *Methylobacillus rhizosphaerae* sp. nov., a novel plant-associated methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of red pepper // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2013. V. 103. P.475–484.
205. Manulis S., Haviv-Chesner A., Brandl M.T., Lindow S., Barash I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* // *Mol. Plant-Microbe Interact*. 1998. V. 11. P. 634–642.
206. Martinez-Romero E. The dinitrogen-fixing bacteria // Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. 3rd ed. New York. N.Y. Springer-Verlag, 2006. V. 2. Chapter 1.24. P. 793–817.
207. Masood A., Khan M.I.R., Fatma M. Asgher M., Per T.S., Khan N.A. Involvement of ethylene in gibberellic acid-induced sulfur assimilation, photosynthetic responses, and alleviation of cadmium stress in mustard // *Plant. Physiol. Biochem*. 2016. V.104. P. 1-10.
208. McDonald I.R., Murrell J.C. The methanol dehydrogenase structural gene *mxhF* and its use as a functional gene probe for methanotrophs and methylotrophs // *Appl. Environ. Microbiol*. 1997. V. 63. P. 3218–3224.
209. McDonald I. R., Doronina N. V., Trotsenko Yu. A., McAnulla C., Murrell, J. C. *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane utilizing bacteria isolated from a polluted environment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2001. V. 51. P. 119–122.
210. McDonald I.R., Warner K.L., McAnnula C., Woodall C.A, Oremland R.S., Murrell J.C. A review of bacterial methyl halide degradation: biochemistry, genetics and molecular ecology // *Environ. Microbiol*. 2002. V. 4. P. 193–203.
211. McDonald I. R., Kampfer P., Topp E., Warner K. L., Cox M. J., Hancock T. L. C., Miller L. G., Larkin M. J., Ducrocq V., Coulter C., Harper D. B., Murrell J. C., Oremland R. S.. *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2005. V. 55. P. 1827–1832.
212. McDonnell L., Plett J.M., Andersson-Gunneras S., Kozela C., Dugardeyn J., Van Der Straeten D., Glick B.R., Sundberg B., Regan S. Ethylene levels are regulated by plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase // *Physiol. Plant*. 2009. V. 136. P. 94–109.
213. Meena K.K., Kumar M., Kalyuzhnaya M.G., Yandigeri M.S., Singh D.P., Saxena A.K., Arora D.K. Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012. V. 101. P. 777–786.

214. Meers J.L., Tempest D.W., Brown C.M. Glutamine (amide): α -oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP) an enzyme involved in biosynthesis of glutamate by some bacteria // J. Gen. Microbiol. 1970. V. 64. P. 187–194.
215. Merzlayak M.N., Solovchchenko A.E. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence // Plant Sci. 2002. Vol. 163. P. 881–888.
216. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. 2002. V. 7. P. 405–410.
217. Moosvi S.A., McDonald I.R., Pearce D.A., Kelly D.P., Wood A.P. Molecular detection and isolation from Antarctica of methylotrophic bacteria able to grow with methylated sulfur compounds // Syst. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 541–554.
218. Moosvi S.A., Pacheco C.C., McDonald I.R., De Marco P., Pearce D.A., Kelly D.P., Wood A.P. Isolation and properties of methanesulfonate-degrading *Afipia felis* from Antarctica and comparison with other strains of *A. felis* // Environ Microbiol. 2005. V. 7(1). P. 22–33.
219. Morrone D., Chambers J., Lowry L., Kim G., Anterola A., Bender K., Peters R.J. Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate *ent*-copalyl diphosphate and *ent*-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum* // FEBS Letters. 2008 V. 583. P. 475–480.
220. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. №3. P. 473–497.
221. Nakazawa H., Kumagai H., Yamada H. Aromatic L-amino acid decarboxylase from *Micrococcus percitreus*: purification, crystallization and properties // Agric. Biol. Chem. 1981. V. 45. P. 2543–2552.
222. Nalayani P., Anandham R., Raj S.P., Chidambaram P. Pink pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMB) - a potential bioinoculant for cotton nutrition // Cotton Res. J. 2014. V. 6. P. 50–53.
223. Nasopoulou C., Pohjanen J., Koskimäki J. J., Zabetakis I., Pirttilä A. M. Localization of strawberry (*Fragaria ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by in situ hybridization // J. Plant Physiol. 2014.V. 171. P. 1099–1105.
224. Neilands J.B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds // J. Biol.Chem. 1995. V.270. P.26723–26726.
225. Nemecek-Marshall M., MacDonald R.C., Franzen J.J., Woiciechowski C.L., Fall R. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development) // Plant Physiol. 1995. V. 108. P. 1359–1368.

226. Neufeld, J. D., Schafer, H., Cox, M. J., Boden, R., McDonald, I. R. & Murrell, J. C. Stable-isotope probing implicates *Methylophaga* spp and novel *Gammaproteobacteria* in marine methanol and methylamine metabolism. // Int Soc Micro Ecol J 2007. V. 1. P. 480-491.
227. Neumann K.-H., Kumar A., Jafargholi I. Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology, principles and practice // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009. P. 227-233.
228. O'Brien J.A., Benkova E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 451.
229. Oberhaensli T., Defago G., Haas D. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase // J. Gen. Microbiol. 1991. V. 137. P. 2273-2279.
230. Omer Z. S., Tombolini R., Gerhardson B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria PPFMs // FEMS Microbiol. Ecology. 2004. V. 47. №3. P. 319-326.
231. Owen R.J., Lapage S.P. The thermal denaturation of partly purified bacterial deoxyribonucleic acid and its taxonomic applications // J. Appl. Bacteriol. 1976. V. 41. P. 335-340.
232. Patt T.E., Cole G.C., Hanson R.S. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria // Int. J. Syst. Bacteriol. 1976. V. 26. P. 226-229.
233. Patten C.L., Glick B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. P. 207-220.
234. Patten C.L., Glick B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 3795-3801.
235. Peel B.D., Quayle J.R. Microbial growth on C₁ compounds. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM1 // Biochem. J. 1961. V. 81. P. 465-469.
236. Perrig D., Boiero M.L., Masciarelli O.A., Penna C., Ruiz O.A., Cassán F.D., Luna M.V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 1143-1150.
237. Peyraud R., Kiefer P., Christen P., Massou S., Portais J.-C., Vorholt J.A. Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway using ¹³C metabolomics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 4846-4851.
238. Piccoli P., Bottini R. Metabolism of 17,17-[2H₂] gibberellins A₂₀ to 17,17-[2H₂] gibberellin A₁ by *Azospirillum lipoferum* cultures // AgriScientia. 1994. V. XI. P. 13-15.
239. Pimentel D., Peshin R., Dhawan A.K. Pesticides and pest control integrated pest management: Innovation-development process // Netherlands: Springer. 2009. P.83-87.

240. Pine L., Hoffman P. S., Malcolm G. B., Benson R. F., Keen M. G.. Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus *Legionella* // J. Clinic. Microbiol. 1984. P. 421-429.
241. Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 3073–3077.
242. Pirttilä A. M., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures // Physiol. Planta. 2004. V. 121. №2. P. 305–312.
243. Pohjanen J., Koskimäki J. J., Sutela S., Ardanov P., Suorsa M., Niemi K., Sarjala T., Häggman H., Pirttilä A.M. Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings *in vitro* // Tree Physiol. 2014. V. 34. № 9. P. 993–1005.
244. Pollmann S., Mueller A., Piotrowski M., Weiler E.W. Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana* // Planta. 2002. V. 216. P. 155–161.
245. Pomini M., Cruz P. L. R., Gai C., Ara'ujo W. L., Marsaioli A. J. Long-chain acyl-homoserine lactones from *Methylobacterium mesophilicum*: synthesis and absolute configuration // J. Natural Prod. 2009. V. 72. № 12. P. 2125–2129.
246. Pomper B.K., Saurel O., Milon A., Vorholt J.A. Generation of formate by the formyltransferase/hydrolase complex (Fhc) from *Methylobacterium extorquens* AM1 // FEBS Lett. 2002. V. 523. P. 133–137.
247. Poonguzhali S., Madhaiyan M., Yim W.J., Kim K.A., Sa T.M. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescentmarked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. P. 1033–1043.
248. Poroshina M.N., Trotsenko Yu.A., Doronina N.V. *Methylobrevis pamukkalensis* gen. nov., sp. nov., a halotolerant restricted facultative methylotroph isolated from saline water // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. P. 1321–1327.
249. Prasad K., Das A.K., Oza M.D., Brahmabhatt H., Siddhanta A. K., Meena R., Eswaran K., Rajyaguru M. R., Ghosh P. K. Detection and quantification of some plant growth regulators in a seaweed-based foliar spray employing a mass spectrometric technique sans chromatographic separation // J. Agr. Food Chem. 2010. V. 58. P. 4594-4601.
250. Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H. *Azospirillum brasilense* indol-3-acetic biosynthesis: evidence for non-tryptophan dependent pathway // Mol. Plant-Microbe Interact. 1993. V. 6. P. 609–615.

251. Qudsaia B., Noshinil Y., Asghari B., Nadia Z., Abida A., Fayazul H. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress // Pak. J. Bot. 2013. V. 45. P. 13–20.
252. Rabaey K., Boon N., Hofte M., Verstraete W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. P. 3401–3408.
253. Rainey F.A., Oren A. Taxonomy of Prokaryotes, 1st Edn. Eds.: Harwood C., Wipat A. Methods in Microbiol. 2011. V. 39. P. 486.
254. Rakshapal S, Sumit KS, Rajendra PP, Alok K. 2013. Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions // Ind. Crop Prod. 45:335–342.
255. Ramasamy D., Mishra A.K., Lagier J.-C., Padhmanabhan R., Rossi M., Sentausa E., Raoult D., Fournier P.-E. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2014. V. 64. P. 384–391.
256. Ras J., Van Ophem P.W., Reijnders W.N.M., van Spanning R.J.M., Duine J.A., Stouthamer A.H., Harms N. Isolation, sequencing and mutagenesis of the gene encoding NAD- and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (GD-FALDH) from *Paracoccus denitrificans*, in which GD-FALDH is essential for the methylotrophic growth // J. Bacteriol. 1995. V. 177. P. 247–251.
257. Renier A., Jourand P., Rapoir S., Poinso V., Sy A., Dreyfus B., Moulin L. Symbiotic properties of *Methylobacterium nodulans* ORS 2060T: a classic process for an atypical symbionts // Soil Biol. Biochem. 2008. V. 40. №6. P. 1404–1412.
258. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208–219.
259. Richter M., Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2009. V. 106. P. 19126–19131.
260. Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growthpromoting bacteria // Dev. Plant Soil Sci. 2006. V. 287. P. 15–21.
261. Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 405–425.
262. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
263. Sanders J. W., Martin J. W., Hooke M, Hooke J. *Methylobacterium mesophilicum* infection: case report and literature review of an unusual opportunistic pathogen // Clin. Infect. Dis. 2000. V. 30. № 6. P. 936–938.
264. Sandrin T.R., Goldstein J.E., Schumaker S. MALDI TOF-MS profiling of bacteria at the strain level: A review // Mass Spectrom. Rev. 2013. V. 32. № 3. P. 188–217.

265. Saotome M., Shirahata K., Nishimura R., Yahaba M., Kawaguchi M., Syono K., Kitsuwa T., Ishii Y., Nakamura T. The identification of indole-3-acetic acid and indole-3-acetamide in hypocotyls of Japanese cherry // *Plant Cell Physiol.* 1993. V. 34. P. 157–159.
266. Scandalios J.G. The rise of ROS // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. P. 483–486.
267. Schaefer J.K., Goodwin K.D., McDonald I.R., Murrell J.C., Oremland R.S. *Leisingera methylohalidivorans* gen. nov., sp. nov., a marine methylotroph that grows on methyl bromide // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 851–859.
268. Schalk I.J., Hannauer M., Braud A. Minireview new roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 2844–2854.
269. Schuetz A., Golbik R., Tittmann K., Svergun D.I., Koch M.H.J., Huebner G., Koenig S. Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. P. 2322–2331.
270. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection & determination of siderophores // *Analytical Biochemistry.* 1987. V. 160. P. 47–56.
271. Sheng F., Xia J.J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria // *Chemosphere.* 2006. V. 64. P. 1036–1042.
272. Siddikee M.A., Hamayun M., Han G.-H., Sa T. Optimization of gibberellic acid production by *Methylobacterium oryzae* CBMB20 // *Korean J. Soil Sci. Fert.* 2010 V. 43. P. 522–527.
273. Skerman V.B.D., McGowan V., Sneath P.H.A. Approved lists of bacterial names // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1980. V. 30. P. 225–420.
274. Sorokin D.Y., Trotsenko Y.A., Doronina N.V., Tourova T.P., Galinski E.A., Kolganova T.V., Muyzer G. *Methylohalomonas lacus* gen. nov., sp. nov. and *Methylohalobium kenyense* gen. nov., sp. nov., methylotrophic gammaproteobacteria from hypersaline lakes // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. V. 57. P. 2762–2769.
275. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. V. 31. P. 425–448.
276. Sperberg J.I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil // *Aust. J. Agric. Res.* 1958. V. 9. P. 778
277. Spies H.S., Steenkamp D.J. Thiols of intracellular pathogens. Identification of ovothiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis* // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 224. P. 203–213.
278. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A., Kämpfer P., Maiden M.C., Nesme X., Rosselló-Móra R., Swings J., Trüper H.G., Vauterin L., Ward A.C., Whitman W.B. Report of the *ad hoc* committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 1043–1047.

279. Suzuki R., Lisdiyanti P., Komagata K., Uchimura T. *MxaF* gene, a gene encoding alpha subunit of methanol dehydrogenase in and false growth of acetic acid bacteria on methanol // J. General Appl. Microbiol. V. 55. 2009. № 2. P 101-110.
280. Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 214–220.
281. Sy A., Timmers A.C.J., Knief C., Vorholt J.A. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 7245–7252.
282. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 512-526.
283. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
284. Tani A., Sahin N., Fujitani Y., Kato A., Sato K., Kimbara K. methylobacterium species promoting rice and barley growth and interaction specificity revealed with whole-cell Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) Analysis // PLoS ONE. 2015. V. 10(6). P. e0129509.
285. Tani A., Sahin N., Matsuyama Y., Enomoto T., Nishimura N. high-throughput identification and screening of novel *Methylobacterium* species using Whole-Cell MALDI-TOF/MS analysis // PLoS ONE. 2012. V. 7(7). P. e40784. doi:10.1371/journal.pone.0040784
286. Thompson C.C., Chimetto L., Edwards R.A., Swings J., Stackebrandt E., Thompson F.L. Microbial genomic taxonomy // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 913. doi:10.1186/1471-2164-14-913.
287. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin, F., Higgins D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 4876–4882.
288. Tien T.M., Gaskins M.H., Hubbell D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // Appl. Environ. Microbiol. 1979. V. 37. №5. P. 1016-1024.
289. Tindall B.J., Rosselló-Móra R., Busse, H.-J., Ludwig W., Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 249–266.
290. Tindall B. J. Respiratory lipoquinones as biomarkers. In Molecular Microbial Ecology Manual, Section 4.1.5, Supplement 1, 2nd edn. Edited by A. Akkermans, F. de Bruijn, D. van Elsas. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Publishers. 2005.

291. Tudzynski B., Bumke C. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria // *Phytochemistry*. 2009. V. 70. P. 1876–1893.
292. Tully R.E., van Berkum P., Lovins K.W., Keister D.L. Identification and sequencing of a cytochrome P450 gene cluster from *Bradyrhizobium japonicum* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1398. P. 243–255.
293. Tuna A.L., Kaya C., Dikilitas M., Higgs D. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants // *Environ. Exp. Bot.* 2008. V.62. P. 1-9.
294. Uchino Y., Hirata A., Yokota A., Sugiyama J. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1998. V. 44. P. 201–210.
295. Urakami T., Tamaoka J., Suzuki K., Komagata K. *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989. V. 39. P. 116–121.
296. Urakami T., Komagata K. Emendation of *Methylobacillus* Yordy and Weaver 1977, a genus of methanol-utilizing bacteria // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986. V. 36. P. 502–511.
297. Van der Palen C.J., Slotboom D.J., Jongejan L., Reijnders W.N., Harms N., Duine J.A., Van Spanning R.J. Mutational analysis of *mau* genes involved in methylamine metabolism in *Paracoccus denitrificans* // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 230. P. 860–871.
298. Van Dien S.J., Okubo Y., Hough M.T., Korotkova N., Taitano T., Lidstrom M.E. Reconstruction of C₃ and C₄ metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis // *Microbiology*. 2003a. V. 149. № 3. P. 601–609.
299. Van Dien S.J., Marx C.J., O'Brien B.N., Lidstrom M.E. Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant // *Appl. Environm. Microbiol.* 2003b. V. 69. P. 7563–7566.
300. Van Dijken J.P., Quayle J.R. Fructose metabolism in four *Pseudomonas* species // *Arch. Microbiol.* 1977. V. 114. P. 281–286.
301. Van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E.A., Menck C.F.M., Da Silva A.C.R., Ferro J.A., Oliveira M.C., Setubal J.C., Kitajima J.P., Simpson A.J. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria // *Annu Rev Phytopathol* 2002. V. 40. P. 169–189.
302. Vasilyeva L.V., Semenov A.M. *Labrys monahos*, a new budding prosthecate bacterium with radial symmetry // *Mikrobiologiya*, 1984, 53, 85–92 // Validation List no. 18 // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1985. V. 35. P. 375–376.

303. Velikova V., Yordanov I., Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines // *Plant Science*. 2000. V. 151. P. 59–66.
304. Vera-Sirera F., Gomez M.D., Perez-Amador M.A. DELLA-proteins, a group of GRAS transcription regulators, mediate gibberellin signaling. In DH Gonzalez, *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*. Ed. Elsevier/Academic Press, San Diego, 2015. P. 313–328. doi: 10.1016/B978-0-12-800854-6.00020-8
305. Vercraene-Eairmal M., Lauga B., Saint Laurent S., Mazzella N., Boutry S., Simon M., Karama S., Delmas F., Duran R. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure // *Chemosphere*. 2010. V. 81. P. 837–843.
306. Vettakkorumakankav N.N., Falk D., Saxena P., Fletcher R.A. A crucial role for gibberellins in stress protection of plants // *Plant Cell Physiol*. 1999. V. 40. P. 542–548 .
307. Vorholt J.A., Chistoserdova L., Stolyar S.M., Thauer R.K., Lidstrom M.E. Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases // *J. Bacteriol*. 1999. V. 181. P. 5750–5757.
308. Vorholt J.A. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria // *Arch. Microbiol*. 2002. V. 178. P. 239–249.
309. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere // *Nat. Rev. Microbiol*. 2012. V. 10. № 12. P. 828–840.
310. Vorob'ev A.V., De Boer W., Folman L.B., Bodelier P.L.E., Doronina N.V., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Dedysh S.N. *Methylovirgula ligni* gen. nov., sp. nov., an obligately acidophilic, facultatively methylotrophic bacterium with a highly divergent *mxoF* gene // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2009. V. 59. P. 2538–2545.
311. Vuilleumier S., Ivoš N., Dean M., Leisinger T. Sequence variation in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases // *Microbiology*. 2001 V. 147. P. 611–619.
312. Wang Q., Xiong D., Zha P., Yu X., Tu B., Wang G. Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance oil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17 // *J. Appl. Microbiol*. 2011. V. 111. P. 1065–1074.
313. Wani S. H., Kumar V., Shriram V., Kumar S. Sah. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants // *Crop J*. 2016. V. 4. P. 162–176.
314. Wellner S., Lodders N., Glaeser S. P., Kämpfer P. *Methylobacterium trifolii* sp. nov. and *Methylobacterium thuringiense* sp. nov., methanol-utilizing, pink-pigmented bacteria isolated from leaf surfaces // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2013. V. 63. P. 2690–2699.

315. Werther T., Spinka M., Tittmann K., Schuetz A., Golbik R., Mrestani-Klaus C., Huebner G., Koenig S. Amino acids allosterically regulate the thiamine diphosphate-dependent α -keto acid decarboxylase from *Mycobacterium tuberculosis* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 5344–5354.
316. Whitaker W.B., Sandoval N. R., Bennett R. K., Fast A. G., Papoutsakis E. T. Synthetic methylotrophy: engineering the production of biofuels and chemicals based on the biology of aerobic methanol utilization // Current Opinion Biotechnol. 2015. V.33. P. 165–175.
317. Winkelmann G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi / G. Winkelmann // Biometals. 2007. V. 20. P. 379–392.
318. Winternans J.F., De Mots G.M. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their phenophytins in ethanol // Biochim et biophysica acta. 1965. V. 109. P.448-453
319. Wood W.A. Assay of enzymes representative of metabolic pathways // Method. Microbiol. 1971. V. 6A. P. 421.
320. Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // Annu Rev Plant Biol. 2008. V. 59. P. 225–51.
321. Yamane K., Rahman Md S, Kawasaki M., Taniguchi M., Miyake H. Pretreatment with a low concentration of methyl viologen decreases the effects of salt stress on chloroplast ultrastructure in rice leaves (*Oryza sativa* L.) // Plant Prod Sci. 2004. V. 7. P. 435–441.
322. Yamashita S., Uchimura T., Komagata K. Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2004. V. 54. P. 865–870.
323. Yi H., Lim Y.W., Chun J. Taxonomic evaluation of the genera *Ruegeria* and *Silici-bacter*: a proposal to transfer the genus *Silicibacter* Petursdottir and Kristjansson 1999 to the genus *Ruegeria* Uchino et al. 1999 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 815–819.
324. Yim W., Woo S., Kim K., Sa T. Regulation of ethylene emission in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and red pepper (*Capsicum annuum* L.) inoculated with ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. // Korean J Soil Sci Fert. 2012. V. 45. P. 37–42.
325. Yordy J.R., Weaver T.L. *Methylobacillus*: a new genus of obligately methylotrophic bacteria // Int J Syst Bacteriol. 1977. V. 27. P. 247-255.
326. Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Genomic organization and biochemistry of the ribulose monophosphate pathway and its application in biotechnology // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 407-416.
327. Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M., Steward G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison // Environ. Microbiol. 2003. V. 5. P. 539–554.
328. Zhang X., Fuller J.H., McIntire W.S. Cloning, sequencing, expression, and regulation of the structural gene for the copper/topa quinone-containing methylamine oxidase from *Arthrobacter* strain P1, a gram-positive facultative methylotroph // J. Bacteriol. 1993. V. 175. P. 5617–5627.

329. Zhang M., Lidstrom M.E. Promoters and transcripts for genes involved in methanol oxidation in *Methylobacterium extorquens* AM1 // Microbiol. 2003. V.149. № 4. P.1033–1040.
330. Zhao H., Jianga M., Liang Q., Song Sh., Wang J., Bai G., Luo G. Fragmentation pathway studies of several plant hormones using an electrospray ionization-quadrupole/time-of-flight mass spectrometer // Int. J. Mass Spectrom. 2013. V. 335. P. 7-15.
331. Zhang W., Zhang T., Wu S., Wu M., Xin F., Dong W., Ma J., Zhang M., Jiang M. Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy // RSC Adv. 2017. V. 7. P. 4083-4091.doi: 10.1039/C6RA27038G
332. Zou X.-L., Li X.-A., Wang X.-M., Chen Q., Gao M., Qiu T.-L., Sun J.-G., Gao J.-L. *Hansschlegelia beijingensis* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from watermelon rhizosphere soil // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 3715-3719