

На правах рукописи

АГАФОНОВА НАДЕЖДА ВАЛЕРИЕВНА

**ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
АЭРОБНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ-ФИТОСИМБИОНТОВ**

Специальность 03.02.03 – Микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино 2017

Работа выполнена в лаборатории радиоактивных изотопов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) в рамках учебной программы аспирантуры 03.02.03 «Микробиология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Пущинский государственный естественно-научный институт (ПущГЕНИ)

Научный руководитель:

Доронина Нина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИБФМ РАН, профессор ПущГЕНИ, г. Пущино

Официальные оппоненты:

Рукавцова Елена Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Филиал Института Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН), г. Пущино

Сердюк Ольга Анатольевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН), г. Пущино

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу 142290, г. Пущино Московской области, проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН. Автореферат размещен на сайте <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.ibpm.ru>

Автореферат разослан «__» октября 2017 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Кулаковская Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Аэробные метилотрофные бактерии – метилобактерии – 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 метилобактерии 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 метилобактерии 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 метилобактерий-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 метилобактерий 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 метилобактерий-фитосимбионтов и исследование реализуемых метилобактериями механизмов положительного влияния на растения.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить чистые культуры метилобактерий 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 метилобактерий синтезировать фитогормоны – гиббереллины;
3. Провести анализ фосфатсольбилизирующей, антагонистической активностей и способности к синтезу сидерофоров у представителей различных родов метилобактерий;
4. Изучить влияние колонизации растений метилобактериями на устойчивость к стрессовым воздействиям, индуцированным гербицидом паракватом;
5. Оценить влияние исследуемых штаммов метилобактерий на рост и морфогенез растений.

Научная новизна работы. Получены новые данные о культивируемых аэробных метилобактериях, 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 метилобактерий, 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 агробιοтехнологии.

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» (Пушино, 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 (Пушино, 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. (ПушГЕНИ) 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. Выражаю благодарность к.б.н. Сузиной Н.Е. за проведение микроскопических исследований, к.б.н. Лауриничюсу 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.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили 37 чистых культур метиловобактерий, выделенных из 28 образцов листьев, хвои и корней различных растений в г. Пушкино (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); а также 10 штаммов метиловобактерий из лабораторной коллекции. Накопительные и чистые культуры выделяли на среде "К" с 0,5% NaCl (в/об) и 1% (об/об) метанола, как описано ранее (Доронина с соавт., 2005). Чистые культуры выращивали при 28°C на минеральной среде "К" с добавлением (0,5%) (об/об) метанола.

В качестве референтных культур использовали коллекционные штаммы: *Methylophila capsulata* ВКМ В-1606^T, *Methylophila oligotropha* ВКМ В-2788^T, *Ancylobacter defluvii* ВКМ В-2789^T, *Ancylobacter vacuolatus* DSM 1277^T, *Ancylobacter polymorphus* DSM 2457^T, *Ancylobacter aquaticus* DSM 101^T, *Ancylobacter rudongensis* DSM 17131^T, *Ancylobacter dichloromethanicus* ВКМ В-2484^T, *Starkeya novella* DSM 506^T, *Methylobacillus gramineus* ВКМ В-2591^T, *Methylobacillus glycogenes* DSM 5685^T.

Культуральные, цитоморфологические и физиологические свойства определяли по стандартным методикам (Doronina et al., 2012; 2013). Морфологию и подвижность клеток изучали посредством оптической фазово-контрастной микроскопии; ультраструктуру – методом электронной микроскопии (Ivanova et al., 2007).

Антагонистическую активность штаммов определяли при совместном культивировании исследуемых штаммов и фитопатогенных грибов (*Verticillium albo-atrum*, *Fusarium sporotrichum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*) либо бактерий (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170, *B. cereus* ATCC 14579^T) по наличию зоны подавления роста.

Хемотаксономические признаки определяли у культур, выращенных на среде "К" или R2A. Убихиноны экстрагировали по известной методике (Collins, 1977) и очищали методом ТСХ (Collins, 1985) с последующим масс-спектрометрическим анализом. Состав фосфолипидов клеток определяли методом ТСХ с применением метчиков и специфических красителей (Kates, 1972). Состав бактериальных жирных кислот определяли, как описано ранее (Doronina et al., 2012).

Количественный анализ индольных соединений определяли колориметрическим методом с реактивом Сальковского (Gordon, Weber, 1951).

Детекцию гиббереллинов в культуральной жидкости проводили методами ТСХ, как описано (Tien et al., 1979), и ВЭЖХ. ВЭЖХ осуществляли на хроматографе LC-20AD ("Shimadzu", Япония) при 206 нм на колонке Shim-pack XR-ODS (75 мм × 3,0 мм, 2,2 мкм). Элюцию осуществляли 30% метанолом, подкисленным 0,01 М Н₃Р₄ до рН 3,0; скорость потока – 0,5 мл/мин. Качественный и количественный анализ гибберелловой кислоты GA₃ проводили методом ЖХ/МС на хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполем Agilent 6490 ("Agilent", США) на колонке Agilent Poroshell C18 (4,6 × 50 мм) ("Agilent", США). Обработку данных проводили в режиме MRM (Multiple Reactions Monitoring). Биотестирование экстракта культуральной жидкости *Mb. arboreus* Iva^T осуществляли на стерильных семенах салата (*Lactuca sativa* L.).

Способность к растворению неорганических фосфатов анализировали на среде "К" с метанолом (0,5% об/об) и Са₃(Р₄)₂ (5 г/л) в качестве единственного источника фосфора. Концентрацию растворенного фосфора определяли в смеси из 2 мл культуральной жидкости и 1 мл реактива "Р", представляющего смесь 1:1 (об/об) раствора 1 (4 мл Тритона X-100, 196 мл деионизованной воды, 6 г (NH₄)₆Мо₇О₂₄·4Н₂О) и раствора 2 (100 мл 6 н НСl; 0,06 г малахитового зеленого), спектрофотометрически при 614 нм по стандартным растворам КН₂Р₄. Детекцию НСООН проводили методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20AD ("Shimadzu", Япония) при 210 нм на колонке ReproGel (250 × 8 мм; 5 мкм). Скорость элюции: 1 мл/мин, мобильная фаза: 9 мМ серная кислота.

Способность к синтезу сидерофоров определяли на среде "К" без источников железа при добавлении хромазуrolа S (CAS-реактива) (Schwyn, Neilands, 1987). Определение катехолового типа сидерофоров проводили колориметрическим методом (Arnou, 1937).

Протеомный МАЛДИ анализ проводили согласно описанной методике (Horneffer et al., 2004) с использованием времяпролетного Autoflex speed масс-спектрометра с матрично-

активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS) ("Bruker Daltonic DmbH", Германия).

Активности ферментов определяли ранее описанными методами (Trotsenko et al., 1986; Doronina et al., 2003; Доронина с соавт., 2008).

Выделение и анализ ДНК. Выделение геномной ДНК проводили по методу Мармура (Marmur, 1961) с последующим анализом. Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Sambrook et al., 1989). Визуализацию плазмидной ДНК проводили методом пульс-электрофореза в агарозных блок-вставках (Alonso et al., 2005). **Нуклеотидный состав ДНК** определяли методом тепловой денатурации (Owen, Larage, 1976), **уровень ДНК-ДНК** сходства изолятов и референтных культур определяли методом ДНК-ДНК реассоциации (De Ley et al., 1970; Доронина и соавт., 1988). Гены, кодирующие 16S рРНК (Lane, 1991), большую субъединицу метанолдегидрогеназы (МДГ) – *txaF* (McDonald, Murrell, 1997), малую субъединицу метиламиндегидрогеназы (МАДГ) – *tauA* (Neufeld et al., 2007), амплифицировали с использованием опубликованных праймерных систем. Нуклеотидные последовательности переводили в аминокислотные в программе Gene Runner, версия 5.0 [Hastings Software, Inc.]. **RAPD-ПЦР** анализ (метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК) проводили, используя праймеры OPQ1, OPQ6 (Balachandar et al., 2008) и RAPDA (Wellner et al., 2013). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Ампликоны очищали с помощью ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep ("Zymo Research", США), секвенировали на автоматическом секвенаторе CEQ2000 XL ("Beckman Coulter", США). **Филогенетический анализ** проводили с помощью пакетов программ BLAST [<http://ncbi.nlm.nih.gov>], CLUSTAL W (Thompson et al., 1997), MEGA версия 5 (Tamura et al., 2011) методом "neighbor-joining" (Santou, Nei, 1987).

Культивирование растений в стерильных условиях *in vitro*. На стерильные семена гороха (*Pisum sativum* L.) и фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) наносили по 100 мкл суспензии штаммов плотностью 10^6 - 10^8 КОЕ/мл, выращивали на 0,7% водном агаре или половинной среде Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) при 23-25°C, 16 ч световом периоде в течение 10-14 сут. Для моделирования условий абиотического стресса 3-недельные растения гороха инкубировали в 5 мкМ растворе параквата в течение 1 ч в темноте и 20 ч на свету, контрольные образцы инкубировали в воде.

Культивирование растений в нестерильных условиях (микровеgetационный опыт). На стерильные семена огурца (*Cucumis sativus* L.) и томата (*Solanum lycopersicum* Mill.) наносили по 100 мкл суспензии штаммов плотностью 10^6 - 10^8 КОЕ/мл, проращивали на 0,7% водном агаре при 23-25°C. На стадии двух семядольных листьев ростки пересаживали в пластиковые сосуды объемом 1,5 л с питательным грунтом, выращивали при 23-25°C и 16 ч световом периоде в течение 45 сут.

Анализ растительного материала. Навеску сырого растительного материала (0,5 г) растирали в охлажденной ступке с 5 мл раствора, содержавшего 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,6 и 0,1 мМ Na_2 -ЭДТА. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 14500 g при 4°C, в полученном супернатанте определяли активности ферментов в пересчете на мг белка (Lowry et al., 1951; Bradford, 1976). Активность каталазы определяли согласно (Beers, Sizer, 1952). Активность пероксидазы определяли, как описано ранее (Pine et al., 1984). Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по скорости ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в системе ксантин-ксантинооксидаза описанным методом (Смирнова, Кондакова, 2004). Содержание эндогенного H_2O_2 определяли, как описано (Velikova et al., 2000). Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали, используя метод Коста (Costa et al., 2002). Содержание пролина определяли по методу Бейтс (Bates et al., 1973). Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилл *a*, *b*, каротиноиды) определяли в 96%-ных спиртовых вытяжках листьев (Wintermans, De Mots, 1965; Корнилина, 2012). Для определения удельной плотности листовой пластинки (УПЛП) из листьев делали высежки площадью 1 см² и высушивали их при температуре 100°C. УПЛП определяли как отношение сухой массы листьев к их площади. Средние значения и стандартные ошибки по каждому варианту исследований вычисляли из трех независимых экспериментов, каждый из которых состоял из 4 биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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. Выделенные в чистую культуру 20 розовоокрашенных штаммов (Frag P, Ver P, Vic P, Aeg P, Tar P, Нур P, Trif P, Beta P, Plan P, Vitis P, Quercus P, Syringa P, Thuja P, Populus P, Betula P, Larix P, Tilia P, Pinus P, Abies P, Picea P) имели высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (98,0-100%) с *Methylobacterium extorquens* ATCC 43645^T (рис. 1).

Желтопигментированный изолят штамм Rosa Y проявлял высокое сходство 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 рРНК с представителем рода *Xanthobacter autotrophicus* ATCC 35674^T. Бесцветный метилотроф штамм Plan w по данным секвенирования гена 16S рРНК имел 98,1% сходства с *Mph. methylotriphus* ATCC 53528^T. Штамм Willow w имел наибольшее сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК 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 рРНК 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 рРНК. Штамм Frag w имеет 100% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК 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 – 98,9 % с *Ancylobacter defluvii* SK15^T (рис. 1).

Показано, что наиболее распространенными культивируемыми метилобактериями, ассоциированными с 20 видами растений Южного Подмосковья, являются розовоокрашенные представители рода *Methylobacterium*, причем доминирует вид *Methylobacterium extorquens*. Бесцветные и желтопигментированные метилотрофные бактерии, ассоциированные с растениями Южного Подмосковья, отнесены к различным родам: *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Hansschlegelia*, *Methylopila*, *Xanthobacter*, *Ancylobacter*, *Delftia* и *Paracoccus*. 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 отобраны для дальнейших исследований.

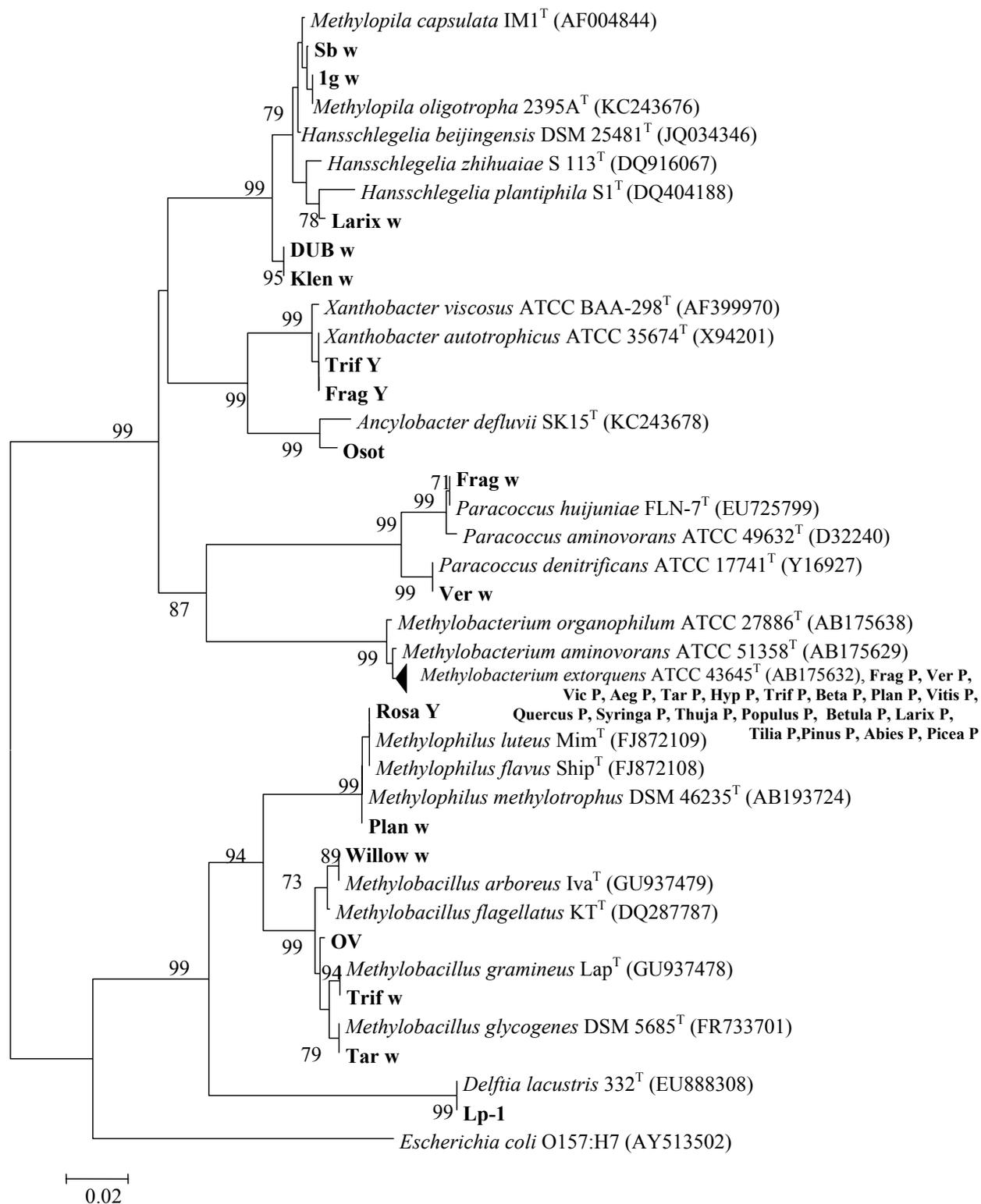


Рис. 1. Филограмма, показывающая положение исследуемых штаммов на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Цифрами 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.

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

Морфология. Новые изоляты – штаммы OV, Lp-1 и Osot, а также выделенный ранее штамм Side1, представлены грамотрицательными подвижными палочками, размножающимися бинарным делением. Спор и простек не образуют (рис. 2).

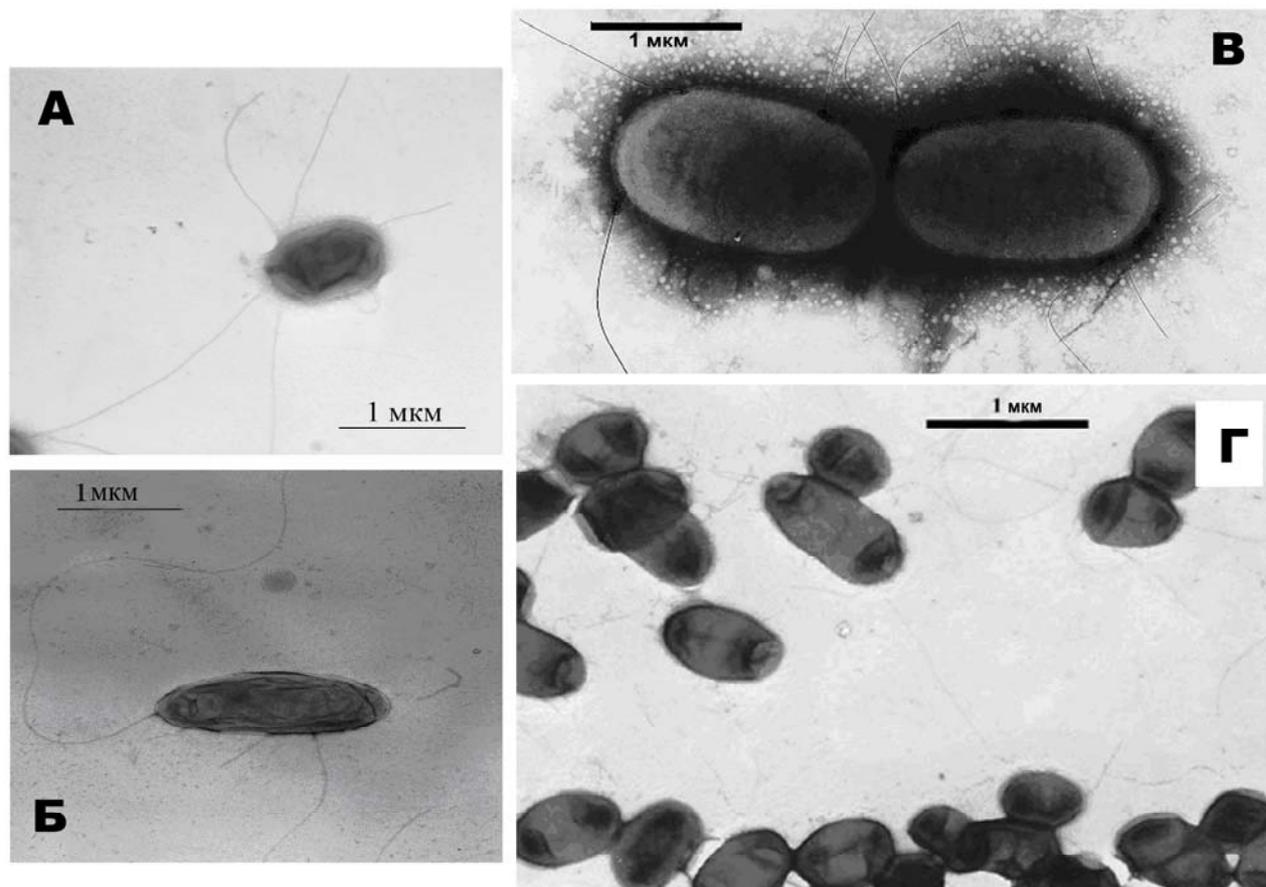


Рис. 2. Морфология клеток штаммов (негативное контрастирование): Side1 (А), OV (Б), Lp-1 (В) и Osot (Г). Длина масштабной метки 1 мкм.

Культуральные, физиолого-биохимические свойства и хемотаксономические свойства. Все исследуемые штаммы мезофильны, предпочитают нейтральные или слабощелочные условия, негалофилы, однако штамм OV способен выдерживать до 3% NaCl в среде. Оптимально растут в присутствии 0,5 – 1% (об/об) метанола в среде. Штамм Side1 растет также на метиламине, триметиламине, фруктозе, этаноле, малате, ацетате, сукцинате, глутамате; штаммы Lp-1 и Osot ассимилируют широкий спектр полиуглеродных субстратов. Следовательно, штаммы Side1, Lp-1 и Osot являются факультативными метиловыми бактериями, тогда как штамм OV, использующий только метанол, – облигатный метилотроф. Наряду с аммонийным азотом, все штаммы используют KNO_3 . Способностью к нитратредукции обладает штамм Lp-1.

Исследуемые штаммы не образуют аммиак или H_2S . Штаммы Lp-1 и Osot способны к автотрофному росту в атмосфере $H_2/O_2/CO_2$. 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 C_{18:1ω7} (76,4%), C_{11Me18:ω7c} (5,3%) и C_{18:0} (4,5%) кислоты. У штамма Lp-1 преобладают C_{16:0} (34,2%), C_{18:1ω7} (17,3%), C_{16:1ω9} (14,5%), C_{11Me16:1} (6,6%) и C_{17cyc} (6,3%) жирные кислоты. Доминирующими жирными кислотами штамма Osot при росте на среде R2A являются C_{18:1ω9c} (49,0%), C_{19:0 cyclo} (38,4%), C_{16:0} (8,4%). В составе жирных кислот клеток штамма OV преобладают C_{16:0} (45,5%), C_{16:1ω7c} (40,7%), C_{17cyc} (8,0%).

Энзимологический анализ. В экстрактах клеток исследуемых штаммов выявлены активности дегидрогеназ метанола, формальдегида и формиата. Новые метилотрофы реализуют различные пути C₁-ассимиляции: штамм Side1 – исл-отрицательный вариант серинового пути C₁-метаболизма; штаммы Lp-1 и Osot – рибулозобисфосфатный (**РБФ**) путь; штамм OV – 2-кето-3-дезоксиглюконоватный вариант рибулозомонофосфатного (**РМФ**) пути (таблица).

Таблица. 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
	НАД ⁺	0	163	53	7
	Гидроксипируватредуктаза	НАДН	1005	552	267
	НАДФН	322	662	214	0
	Серин-глиоксилатминотрансфераза	НАДН	422	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-фосфоглюконоватдегидрогеназа	НАД ⁺	4	192	0	110
	НАДФ ⁺	4	66	107	244
2-Кето-3-дезоксиглюконоватальдолаза		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 ±5%), н.о. – не определяли

Филогенетический анализ. Штамм Lp-1 имеет высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с представителями рода *Delftia*: 99,9% с *D. lacustris* 332^T, 99,8% с *D. tsuruhatensis* T7^T (рис. 3).

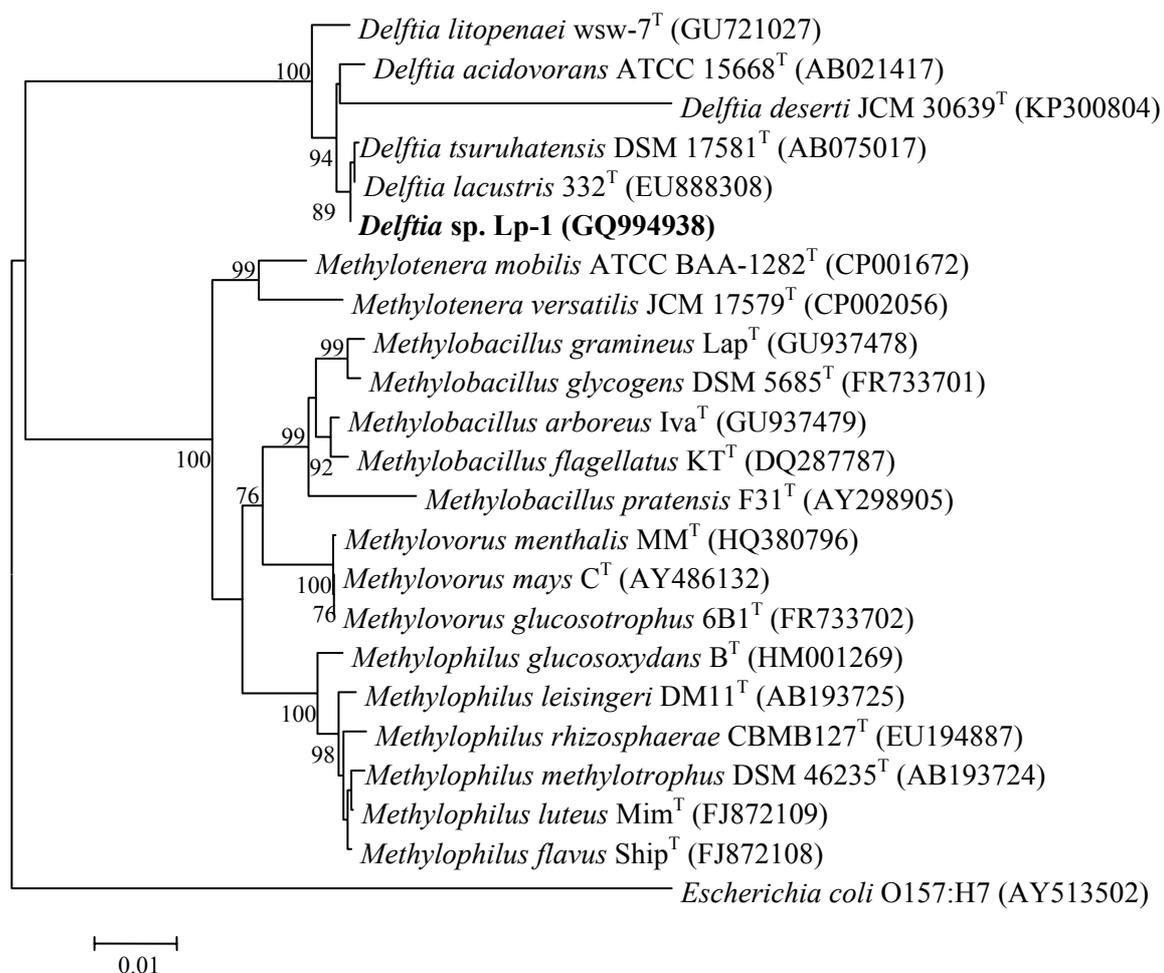


Рис. 3. Филограмма, показывающая положение штамма Lp-1 на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК. Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен 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.

Содержание Г+Ц пар в ДНК у штамма Lp-1 составляет 67 мол. %. Для рода *Delftia* характерно содержание Г+Ц пар 67-69 мол. %. На основании уровня сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК, а также ряда морфологических и хемотаксономических признаков, новый изолят идентифицирован как *Delftia* sp. Lp-1. Сравнительный анализ транслированной аминокислотной последовательности гена *txaF* показал наибольшее сходство *Delftia* sp. Lp-1 с представителями родов порядка *Rhizobiales*: 94,0% с *Angulomicrobium tetraedrale* DSM 5895^T, 91,9% со *Starkeya novella* DSM 506^T и 85,5% с *Ancylobacter dichloromethanicum* DM16^T, также реализующими РБФ путь С₁-метаболизма. Поскольку *Delftia* sp. Lp-1 имеет классическую PQQ-зависимую МДГ (показаны активность фермента и наличие *txaF* гена), предполагается, что данный штамм мог приобрести способность окислять метанол в результате горизонтального переноса генов от других родственных метиловобактерий. У *Delftia* sp. Lp-1 плазмидная ДНК не обнаружена методами щелочного лизиса и пульс-электрофореза в агарозных блок-вставках. Таким образом, нами впервые описан метилотрофный представитель рода *Delftia*, способный расти на метаноле – естественном продукте метаболизма растений.

Штамм Side1, имеющий 97,2-98,0% сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с представителями рода *Methylophilus* (рис. 4) и лишь 32, 37 и 34% ДНК-ДНК

гомологии с *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. capsulata* IM1^T, *Mp. oligotropha* 2395A^T, соответственно, отнесен к новому виду *Methylopila turkensis* sp. nov.

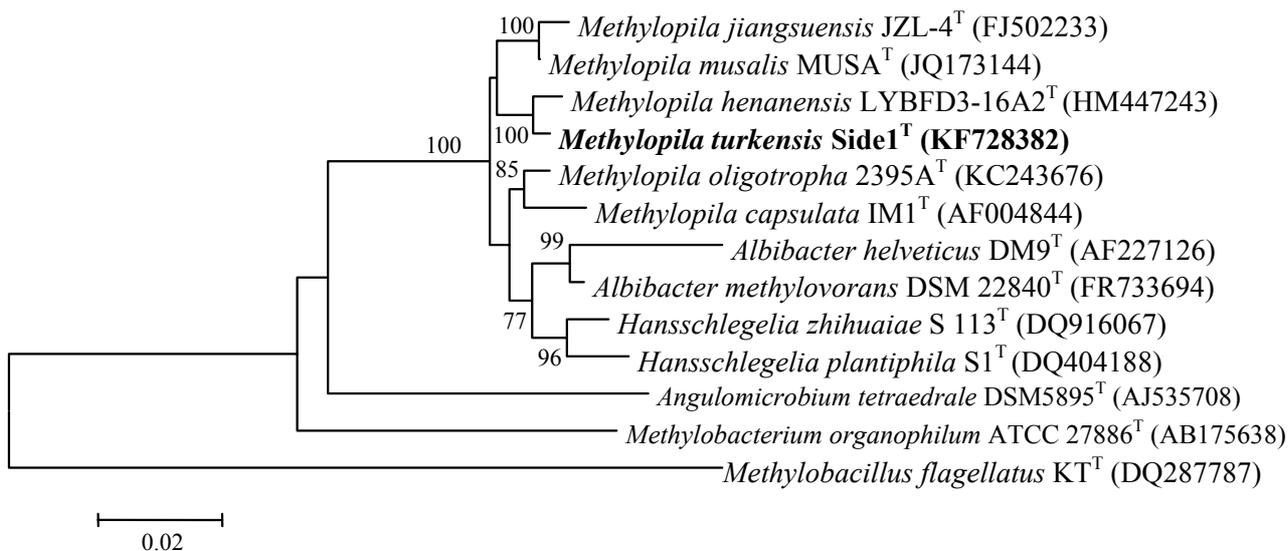


Рис. 4. Филограмма, показывающая положение штамма Sidel1 на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень определен включением последовательности *Methylobacillus flagellatus* КТ^T (DQ287787) в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (значения выше 70%), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 100 альтернативных деревьев.

По данным секвенирования фрагмента гена большой субъединицы метанолдегидрогеназы *mtxA*F, штамм Sidel1 имеет 97,1 % сходства аминокислотных последовательностей с *Mp. jiangsuensis* JZL-4^T и *Mp. helvetica* DM9^T. По данным секвенирования фрагмента гена малой субъединицы метиламиндегидрогеназы *mauA*, штамм Sidel1 имеет 98,8% сходства аминокислотных последовательностей с *Methylopila musalis* MUSA^T.

Отмечено высокое разрешение метода МАЛДИ масс-спектрометрии для идентификации представителей рода *Methylopila* на видовом уровне. Проведенный МАЛДИ анализ масс-спектров препаратов бактериальных клеток представителей рода *Methylopila* показал, что штамм Sidel1 четко обособляется от всех остальных видов рода *Methylopila* (рис. 5), что подтверждает новый видовой статус исследуемого штамма.

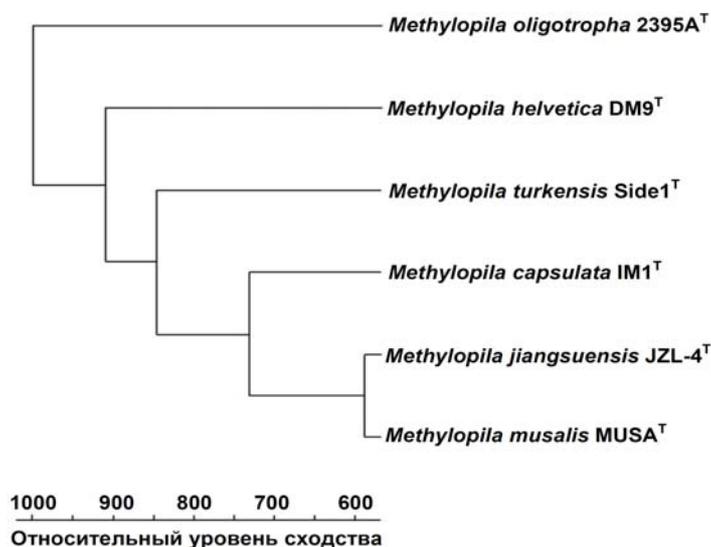


Рис. 5. Дендрограмма суммарных масс-спектров представителей рода *Methylopila*, построенная с использованием программы BioTyper 2.0 (“Bruker Daltonics”).

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. 6).

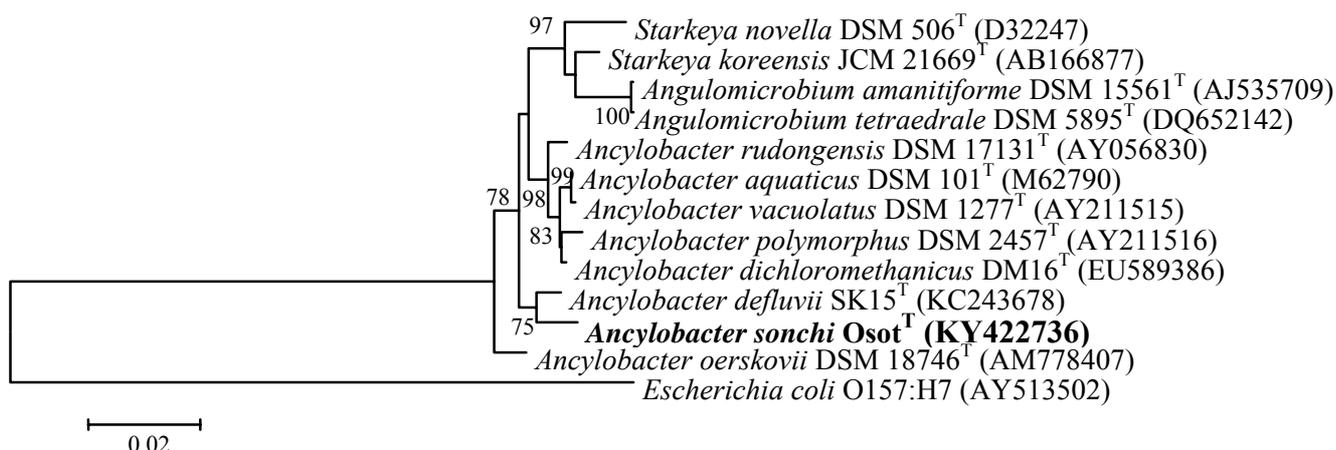


Рис. 6. Филограмма, показывающая положение штамма *Osot* на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). 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.

Уровень ДНК-ДНК гомологии между штаммом *Osot* и штаммами *A. defluvii* SK15^T и *A. rudongensis* AS1.1761^T составляет 27 и 29%, соответственно. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка MxaF подтвердил высокий уровень сходства штамма *Osot* с другими видами *Ancylobacter* (89,0 - 92,9%).

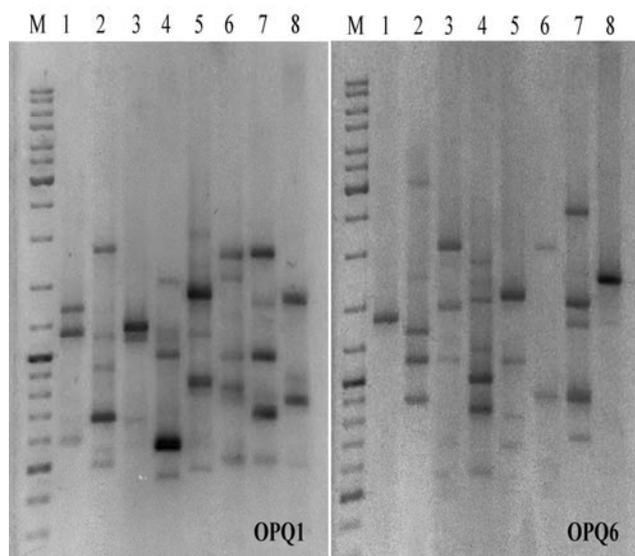


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов амплификации OPQ1-, OPQ6-фрагментов (RAPD-ПЦР) из ДНК штаммов: 1 – *Osot*, 2 – *A. defluvii* VKM B - 2789^T, 3 – *A. vacuolatus* DSM 1277^T, 4 – *A. polymorphus* DSM 2457^T, 5 – *A. aquaticus* DSM 101^T, 6 – *A. rudongensis* DSM 17131^T, 7 – *A. dichloromethanicus*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

Для определения генотипических различий между штаммом *Osot* и ближайшими представителями, 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. 7). На основании полученных морфологических, физиологических, хемотаксономических, биохимических и генетических характеристик штамм *Osot* отнесен к новому виду, для которого предложено название *Ancylobacter sonchi* sp. nov.

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* ТК 0113^T (рис. 8). Уровень ДНК-ДНК гомологии между штаммом *OV* и *Mb. gramineus* Lap^T составляет лишь 52%. По данным секвенирования фрагмента гена большой субъединицы

метанолдегидрогеназы *mxaF*, штамм OV имеет 100% сходство аминокислотных последовательностей с *Methylobacillus flagellatus* КТ^Т.

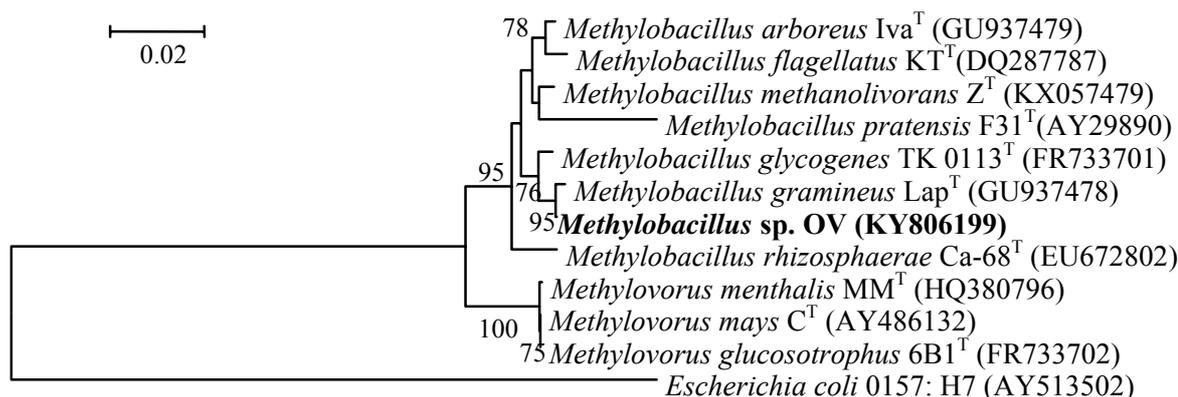


Рис. 8. Филограмма, показывающая положение штамма OV на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует 2 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционное расстояние). Использован метод присоединения соседей (“neighbor-joining”). Корень 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.

Для определения генотипических различий между штаммом OV и *Mb. gramineus* Lap^Т и *Mb. glycogenes* ТК 0113^Т использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ) (рис. 9), результаты которого свидетельствуют, что штаммы OV, Lap^Т и ТК 0113^Т представляют собой отдельные виды. Кроме того, в профилях полярных липидов штаммов *Mb. gramineus* Lap^Т и *Mb. glycogenes* ТК 0113^Т наблюдали наличие нескольких неидентифицированных аминокислотных липидов, которые отличают известные виды от профиля штамма OV (рис. 10).

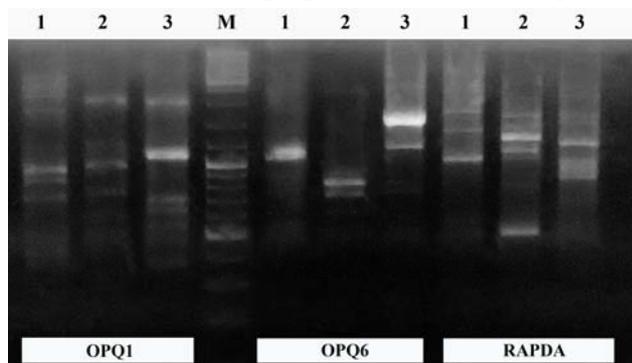


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов амплификации OPQ1-, OPQ6- и RAPDA-фрагментов (RAPD-ПЦР) из ДНК штаммов: 1 – OV, 2 – *Mb. gramineus* Lap^Т, 3 – *Mb. glycogenes* ТК 0113^Т. М – маркер молекулярных масс (GenRuler DNA ladder mix, Fermentas).

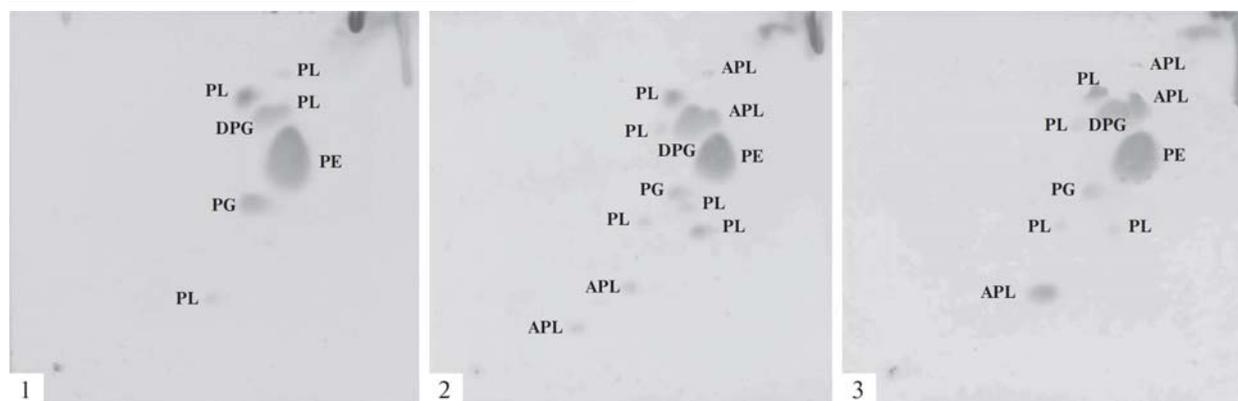


Рис. 10. Полярные липиды штаммов: 1 – OV, 2 – *Mb. gramineus* Lap^Т, 3 – *Mb. glycogenes* ТК 0113^Т после разделения двумерной тонкослойной хроматографией: фосфатидилглицерин (PG); фосфатидилэтаноламин (PE); дифосфатидилглицерин (DPG); неидентифицированные аминокислотные липиды (APLs); неидентифицированные фосфолипиды (PLs).

Таким образом, штамм OV на основании исследования морфологических, физиологических, хемотаксономических, биохимических и генетических признаков штамм OV отнесен к новому виду, для которого мы предлагаем название '*Methylobacillus caricis*' sp. nov. (полные диагнозы новых таксонов приведены в диссертации).

3. Синтез фитогормонов аэробными метилотрофными бактериями, ассоциированными с растениями

Синтез ауксинов. Обнаружено, что независимо от таксономического положения все выделенные нами чистые культуры метилотрофных бактерий синтезируют индолпроизводные – фитогормоны ауксины, концентрация которых составляла в культуральной жидкости от 3 до 50 мкг/мл.

Синтез гиббереллинов. Предварительный анализ культуральной жидкости нескольких штаммов метилобактерий на наличие гиббереллинов выявил их образование у *Methylobacillus arboreus* Iva^T. Методами ТСХ и ВЭЖХ выявлено вещество, соответствующее по R_f и времени удержания (6,5 мин) стандарту гибберелловой кислоты GA₃. Проведенный анализ ЖХ/МС анализ этого вещества подтвердил структуру гибберелловой кислоты GA₃ у метилотрофа *Mb. arboreus* Iva^T; концентрация гибберелловой кислоты GA₃ составила 3,18±0,23 нг/мл культуральной жидкости.

Метанольный экстракт, содержащий синтезируемую *Mb. arboreus* Iva^T гибберелловую кислоту GA₃, использовали в биотестах по влиянию на рост гипокотилей салата. Длина гипокотилей, обработанных экстрактом *Mb. arboreus* Iva^T (3,30±0,17 см) (рис. 11.2), в 1,4-1,8 раза превышала длину гипокотилей в отрицательном контроле (2,16±0,15 см) (рис.11.1), но была близка длине гипокотилей в положительном контроле (3,42±0,20 см) (рис.11.3). Следовательно, обработка экстрактом культуральной жидкости *Mb. arboreus* Iva^T стимулировала удлинение ростков салата.

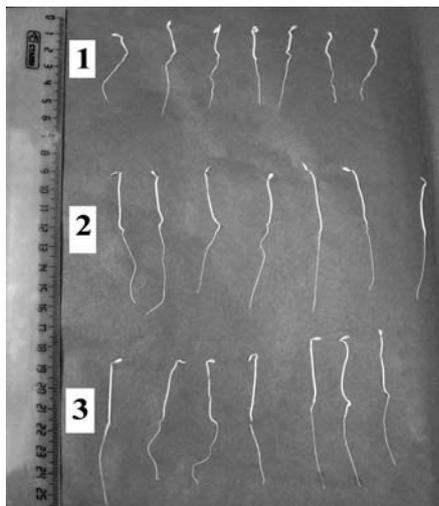


Рис. 11. Ростки салата (*Lactuca sativa* L.) после обработки
1 – 5%-м метанолом,
2 – экстрактом культуральной жидкости *Mb. arboreus* Iva^T в 5%-ом метаноле,
3 – гибберелловой кислотой GA₃ в 5%-ом метаноле (3,5 нг/мл)

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 нами показано (см. раздел 7), что колонизация растений гороха штаммом *Mb. arboreus* Iva^T в условиях гербицидного стресса (параquat) стимулировала рост, повышала содержание фотосинтетических пигментов и стрессоустойчивость растений. Вероятно, наряду с другими механизмами положительного влияния метилотрофа на растения это обусловлено и синтезом гибберелловой кислоты. Следовательно, выявлен новый механизм в основе диалога метилотрофного фитосимбионта *Mb. arboreus* Iva^T с растениями.

4. Фосфатсольбилизирующая активность аэробных метилотрофных бактерий

При выращивании исследуемых штаммов на среде “К” с Ca₃(PO₄)₂ вокруг колоний ряда штаммов (*Delftia* sp. Lp-1, *Mb. extorquens* G10, *A. sonchi* Osot^T и *Mp. musalis* MUSA^T) на 10 сут культивирования появились зоны просветления, свидетельствующие о растворении Ca₃(PO₄)₂ в среде.

Несмотря на отсутствие явно выраженных зон просветления у других культур на агаризованной среде, все исследуемые штаммы на жидкой среде с Ca₃(PO₄)₂ растворяли неорганический фосфор. 11 штаммов метилобактерий: *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 фосфатсольбилизирующую активность – от 230 до 280 мкг/л культуральной жидкости. В контроле с полным отсутствием источника фосфора (КН₂РО₄, Са₃(РО₄)₂) исследуемые метиловобактерии не росли. В стерильной среде с Са₃(РО₄)₂ через 7 сут инкубации контрольных колб при 28°С и 150 об/мин растворимый фосфор не обнаружен. Метаболизм метанола сопровождался выделением муравьиной кислоты (2–7 мМ), при этом величина рН в ходе культивирования снижалась с 7,4 в начале культивирования до 4,8–5,3. При достижении этого значения рН дальнейший рост культур ингибировался.

Поскольку объектами нашего исследования служили представители различных родов метиловобактерий, реализующих разные пути С₁-метаболизма (рибулозомонофосфатный – *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, рибулозобисфосфатный – *Delftia*, *Ancylobacter* и сериновый – *Methylopila*, *Methylobacterium*), очевидно, что фосфатсольбилизирующая активность является характерной способностью метилотрофов. Таким образом, впервые обнаружена способность метиловобактерий растворять трикальцийфосфат, который далее может вовлекаться в фосфорный метаболизм, как микроорганизмов, так и растений.

5. Исследование способности к синтезу сидерофоров

Первоначальный скрининг для обнаружения продукции метиловобактериями сидерофоров проводили с использованием общепринятого теста на CAS-агаре. Рост некоторых исследуемых штаммов сопровождался появлением зон, различных по интенсивности изменения цвета индикатора, что указывало на образование сидерофоров. 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 и *Mp. turkensis* Side1^T, *Delftia* sp. Lp-1, *A. sonchi* Osot^T, при этом показано, что штаммы *Mp. musalis* MUSA^T, *M. extorquens* G10, *A. sonchi* Osot^T, *Delftia* sp. Lp-1 синтезируют сидерофоры катехолового типа.

6. Исследование антагонистической активности

14 штаммов аэробных метилотрофных бактерий различного таксономического положения проверили на проявление антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам и грамположительным бактериям рода *Bacillus*. Несмотря на способность штаммов к синтезу сидерофоров, рост фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *Fusarium sporotrichum* подавлял лишь *Delftia* sp. Lp-1 (рис. 12).

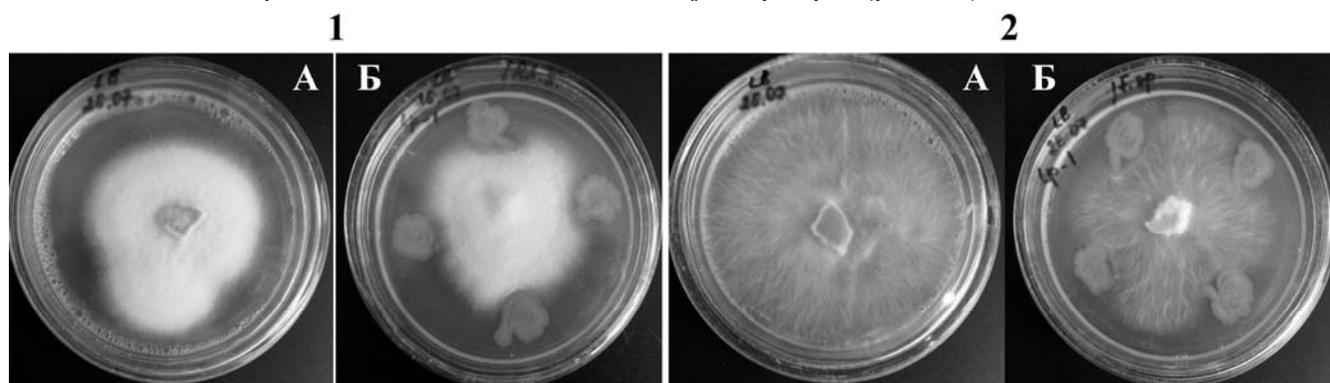


Рис. 12. Антагонистическая активность штамма *Delftia* sp. Lp-1 по отношению к фитопатогенным грибам. А – контроль, Б – подавление роста *Rhizoctonia solani* (1), *Fusarium sporotrichum* (2).

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. 13).

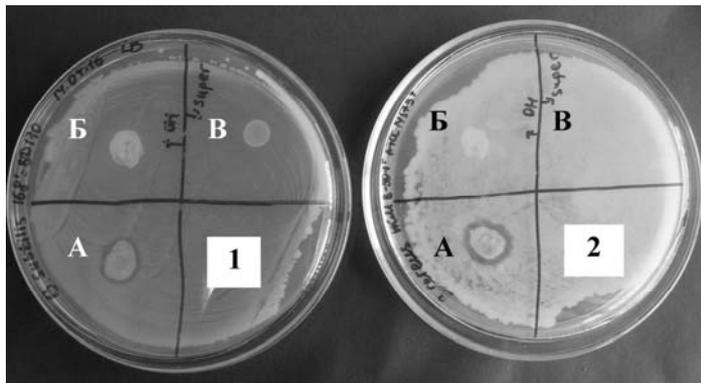


Рис. 13. Антагонистическая активность штамма *Delftia* sp. Lp-1 по отношению к грамположительным бактериям *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* BD170 (1) и *B. cereus* ATCC 14579^T (2). А – *Delftia* sp. Lp-1, выращенные на среде LB, Б – *Delftia* sp. Lp-1, выращенные на среде “К”, В – бесклеточная 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.

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

Изучено влияние колонизации гороха (*Pisum sativum* L.) аэробными метиловыми бактериями пяти различных видов (*Mb. arboreus* Iva^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. turkensis* Side1^T, *M. extorquens* G10, *Mph. flavus* Ship^T) на устойчивость растений к стрессовым воздействиям, индуцированным гербицидом паракватом.

Показано, что и колонизированные метиловыми бактериями, и неколонизированные (контроль) растения оказались восприимчивыми к воздействию окислительного стресса, вызванного паракватом, о чем свидетельствует повышение активностей антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД) – в 1,5-2,0 раза, каталазы – в 1,5-3,0 раза) (рис. 14). Активность пероксидазы максимально возросла у растений, колонизированных штаммом G10, тогда как у других инокулированных растений и в контроле изменилась не более чем в 1,5 раза. Наибольшая концентрация пероксида водорода – продукта дисмутации супероксида-аниона в клетках – наблюдалась у неколонизированных растений (рис. 14).

При этом содержание малонового диальдегида (МДА) – конечного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ), ключевого показателя повреждения клеточных мембран растений – в листьях неколонизированного гороха было в 1,5-3,0 раза выше, чем в варианте с инокулированными растениями, что свидетельствует о значительном повреждении мембран контрольных растений (рис. 15). Концентрация пролина – низкомолекулярного метаболита-антиоксиданта, обладающего полифункциональным защитным действием в ответ на неблагоприятные изменения условий среды – у растений, колонизированных штаммами Iva^T, MUSA^T, G10, Ship^T, повышалась в 1,5-1,7 раза, что могло снижать повреждение клеток при стрессе. 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.

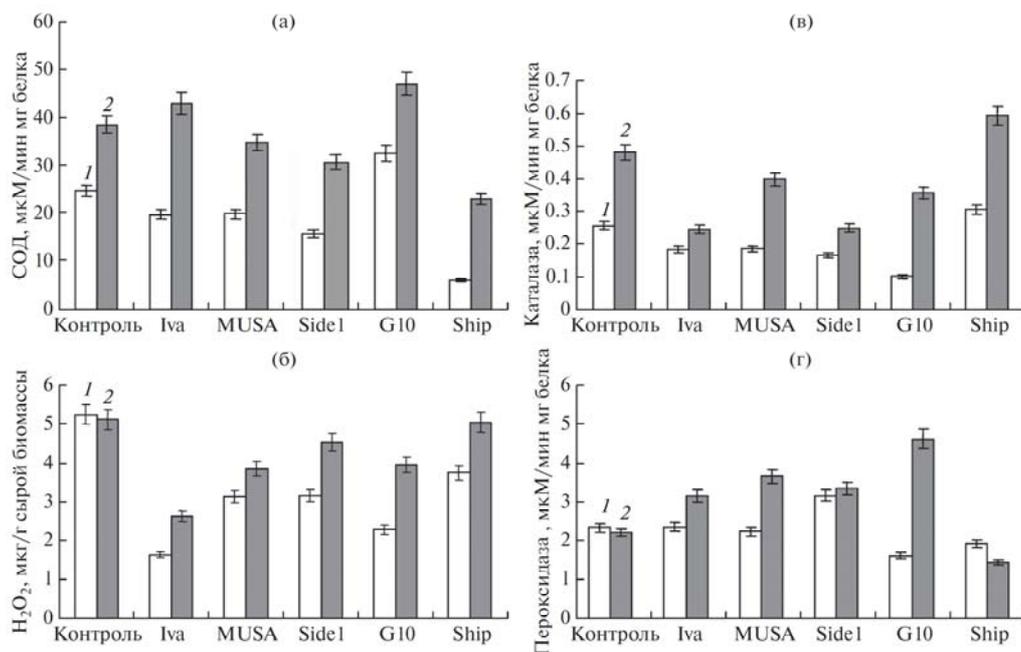


Рис. 14. Активности СОД (а), каталазы (в) и пероксидазы (г) и концентрация эндогенного H₂O₂ (б) в листьях неколонизированных (контроль) и колонизированных различными штаммами мезобактерий *Mb. arboreus* Iva^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. turkensis* Side1^T, *M. extorquens* G10, *Mph. flavus* Ship^T растений гороха, выращенных в нормальных условиях (1) и после действия параквата (2).

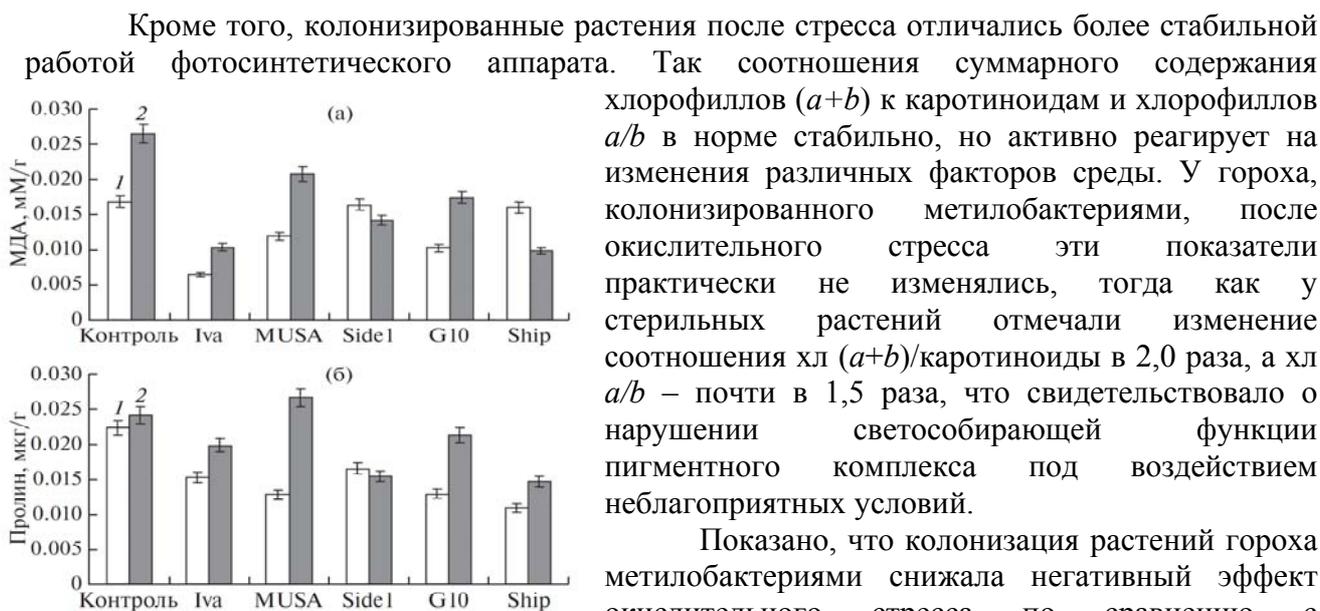


Рис. 15. Содержание малонового диальдегида (а) и пролина (б) в листьях неколонизированных (контроль) растений гороха и колонизированных различными штаммами мезобактерий *Mb. arboreus* Iva^T, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mp. turkensis* Side1^T, *M. extorquens* G10, *Mph. flavus* Ship^T в нормальных условиях (1) и после воздействия паракватом (2).

8. Стимуляция роста растений, колонизированных аэробными метилобактериями

Влияние колонизации различными штаммами метилобактерий на рост растений фасоли и гороха, культивируемых *in vitro*. После инокуляции семян фасоли на 14 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. 16 А). Также результаты по влиянию на рост и развитие растений гороха, колонизированных штаммами *Mp. capsulata* Minsk, *A. sonchi* Osot^T, *M. extorquens* Ps2, *Mp. turkensis* Side1^T показаны на рис. 16 Б. Длина стебля колонизированных растений фасоли и гороха в 1,5-3,0 раза выше по сравнению с контролем.



Рис. 16. Растения фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) (А) и гороха (*Pisum sativum* L.) (Б), контрольные и колонизированные метилобактериями.

А: 1 – контроль (неинокулированный); фасоль, колонизированная штаммами: 2 – *Mp. musalis* MUSA^T, 3 – *Delftia* sp. Lp-1, 4 – *Mph. flavus* Ship^T, 5 – *Mb. arboreus* Iva^T, 6 – *M. extorquens* G10.

Б: справа контроль (неинокулированный), слева горох, колонизированный штаммами: 7 – *Mp. capsulata* Minsk, 8 – *A. sonchi* Osot^T, 9 – *M. extorquens* Ps2, 10 – *Mp. turkensis* Side1^T.

Кроме того, во время опытов отмечено, что колонизированные растения быстрее начинали формировать корневую систему, первые настоящие листья. В аналогичных опытах, поставленных на семенах гороха, колонизированных метилобактериями различного таксономического положения, наблюдали развитие растений в динамике. К 4 суткам роста разница в высоте побегов и формировании корневой системы не наблюдалась (рис. 17).

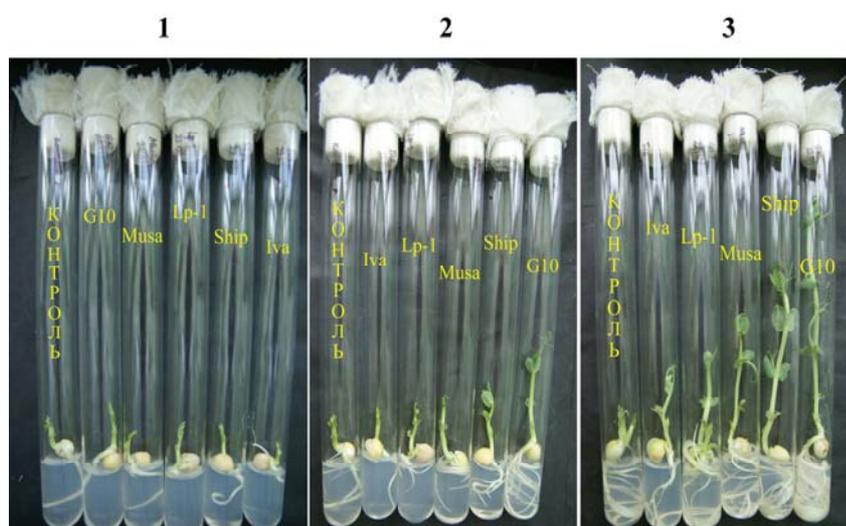


Рис. 17. Растения гороха (*Pisum sativum* L.), культивируемые *in vitro*, на 4 (1), 6 (2) и 10 (3) сутки роста, контрольные (контроль) и колонизированные штаммами метилобактерий (*Mb. arboreus* Iva^T, *Delftia* sp. Lp-1, *Mp. musalis* MUSA^T, *Mph. flavus* Ship^T, *M. extorquens* G10).

Однако уже на 6 сутки ростки опытных растений заметно вытянулись и к 10 суткам высота стебля колонизированных растений в 2-5 раз превышала контроль, в то время как масса зеленой части была больше в 2-3 раза. Также отмечено увеличение массы корневой системы и количества боковых корней в 2-4 раза в опыте по сравнению с контролем. Таким образом, колонизация исследуемыми штаммами метилобактерий растений фасоли и гороха стимулировала рост побегов и формирование корневой системы в условиях культивирования *in vitro*.

Влияние колонизации метиловобактериями 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 появлялись 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, колонизированные штаммами *Mv. glucosotrophus* 34, *A. sonchi* Osot^T, *Mp. capsulata* Sb и Minsk (рис. 18), показали значительное увеличение в высоте стебля (1,5-2,0 раза), количестве листьев (1,6-2,0 раза) и длине корневой системы (1,7-2,6 раза). Таким образом, исследуемые штаммы метиловобактерий оказывали значительное положительное влияние на рост растений огурца (*Cucumis sativus* L.) в микровегетационных экспериментах в нестерильных условиях.



Рис. 18. Влияние инокуляции различными метиловобактериями на рост и развитие огурца (*Cucumis sativus* L.). 1 – контроль, 2 – *Mv. glucosotrophus* 34, 3 – *A. sonchi* Osot^T, 4 – *Mp. oligotropha* Sb, 5 – *Mp. capsulata* Minsk.

Влияние колонизации метиловобактериями на рост и морфогенез растений томата в микровегетационных условиях. Показано, что инокуляция метиловобактериями заметно повлияла на развитие корневой системы, т. к. все опытные растения отличались длиной (на 15-46%) и массой (в 1,5-2,0 раза) корневой системы. Удельная плотность листовых пластинок колонизированных растений увеличивалась в 1,5-2,3 раза по сравнению с УПЛП контрольных растений. Соотношения ХЛ *a/b* опытных и контрольных растений находились в пределах нормы (2,0–3,0). Однако колонизация метиловобактериями растений томата приводила к увеличению содержания в листьях фотосинтетических пигментов: 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 фитосимбиоза и свидетельствует о положительном влиянии инокуляции растений данными штаммами. Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о более активной работе фотосинтетического аппарата и повышенной продуктивности растений, колонизированных метиловобактериями.

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 Подмосквья, 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*, рибулозобисфосфатный – *Delftia*, *Ancylobacter* и сериновый – *Methylopila*, *Methylobacterium*), очевидно, что фосфатсольюбилизирующая 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 катехолового типа выявлено у *Mp. 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 метиловыми бактериями существенно повышала адаптивную защиту и устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, так как в присутствии гербицида параквата колонизированные растения отличались более высокими активностями антиоксидантных ферментов, стабильными фотосинтетическими показателями и менее интенсивным накоплением продуктов перекисного окисления липидов, чем неколонизированные растения.

Таким образом, расширено представление о биоразнообразии аэробных метилотрофных бактерий, ассоциированных с растениями, обнаружены новые механизмы диалога метиловых бактерий 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: *Mp. 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 фосфатсолобилизирующая 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 катехолового 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 гнодобриотических растений и растений, выращенных нестерильно, что указывает на перспективность их применения в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных культур.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

- 1) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фосфатсолубилизирующая активность аэробных метиловобактерий // Микробиология. 2014. Т.83. № 1. С. 28–32.
- 2) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. *Methylopila turkiensis* sp. nov. – новый аэробный факультативно метилотрофный фитосимбионт // Микробиология. 2015. Т.84. № 4. С. 456–465.
- 3) **Агафонова Н.В.**, Доронина Н.В., Троценко Ю.А.. Повышение устойчивости растений гороха к окислительному стрессу, вызванному паракватом, при колонизации аэробными метиловобактериями // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 2. С. 210–216.
- 4) **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. Микробиология. 2017. Т.86. №1. С.88-98.
- 5) Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Мустахимов И.И., **Агафонова Н.В.**, Троценко Ю.А.. Биоразнообразие аэробных метиловобактерий, ассоциированных с филлосферой растений Южного Подмосковья // Микробиология. 2017. Т. 86. №1. С.107-113.
- 6) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. *Methylobacillus caricis* sp. nov. – облигатный метилотроф, выделенный из корней осоки (*Carex* sp.) // Микробиология. 2017. Т. 86. №6. С.
- 7) **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
- 8) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Облигатный метилотроф *Methylobacillus arboreus* Iva^T синтезирует фитогормон - гибберелловую кислоту GA₃ // Микробиология. 2018. Т. 87. №1. С.

Тезисы:

- 1) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н. Аэробные метиловобактерии, ассоциированные с растениями, синтезируют ауксины, гиббереллины и растворяют минеральные фосфаты. Тезисы 16-й Международной Пушчинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века». Пушкино. 2012. С.5.
- 2) **Агафонова Н.В.** Аэробные метиловобактерии как стимуляторы роста растений. Материалы международной конференции «Биология – наука XXI века». Российский экономический университет им. Г.В.Плеханова. Москва. 2012. С.5-6.
- 3) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В. Стимуляция роста и морфогенеза растений *in vitro* аэробными метиловобактериями *Methylobacterium extorquens* G10. Сборник тезисов VIII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». ИНМИ РАН. Москва. М.: МАКС-Пресс. 2012. С.3-4.
- 4) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н. Способность аэробных метиловобактерий к солубилизации минеральных фосфатов. Сборник тезисов V Всероссийского с международным участием медико-биологического конгресса молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012». Тверь: «Заповедник Времени». 2012. С. 314-315.
- 5) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н. Механизмы влияния аэробных метиловобактерий *Methylobacterium extorquens* G10 на рост растений. Сборник тезисов 17-й Международной Пушчинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века». Пушкино. 2013. С.3.
- 6) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В. Стимуляция роста растений аэробными метиловобактериями *Delftia* sp. Lp-1. Материалы VI Международной конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция». Одесса. Одесса: Печатный дом. 2013. С. 206-207.

- 7) **Агафонова Н.В.** Стимуляция роста растений аэробными метилобактериями *Methylobacterium extorquens* NVD. *Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2013»*. Тула. 2013. С. 28.
- 8) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н. *Methylopila turkiensis* sp. nov. – новый аэробный метилотрофный фитосимбионт. *Сборник тезисов 18-й Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века»*. Пушкино. 2014. С.192-193.
- 9) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н. Физиолого-биохимические основы фитосимбиоза метилобактерий *Methylopila turkiensis* Sidel и *Methylopila tusalis* MUSA. *Первая Пуцинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»*. ИБФМ РАН. Пушкино. 2014. С.58-59.
- 10) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Мустахимов И.И. Влияние колонизации метилобактериями рода *Methylopila* на рост, морфогенез и антиоксидантную защиту растений. *Сборник тезисов 19-й Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века»*. Пушкино. 2015. С.154-155.
- 11) **Агафонова Н.В.**, Доронина Н.В. Влияние аэробных метилобактерий на систему антиоксидантной защиты растений гороха после окислительного стресса. *Материалы Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2015»*. ТулГУ. Тула. 2015. С. 25.
- 12) **Агафонова Н.В.**, Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Колонизация метилобактериями повышает антиоксидантную защиту растений в условиях окислительного стресса. *II Пуцинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»*. ИБФМ РАН. Пушкино. 2015. С. 98-99.
- 13) **Агафонова Н.В.**, Доронина Н.В. Аэробные метилобактерии стимулируют рост и повышают стрессоустойчивость растений гороха. *Международная научно-практическая конференция: «Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству» в рамках III Международных Фарабиевских чтений*. Алматы: Казак университеті, 2016. С. 34.
- 14) **Агафонова Н.В.**, Доронина Н.В. Стимуляция роста и повышение антиоксидантной защиты растений гороха при колонизации аэробными метилобактериями *Methylobacillus arboreus* Iva. *Сборник тезисов 20-й Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века»*. Пушкино. 2016. С.6.
- 15) **Агафонова Н.В.**, Капаруллина Е.Н., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Факультативно-метилотрофный фитосимбионт *Delftia* sp. Lp-1, выделенный из клубеньков люпина. *III-я Пуцинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»*. ИБФМ РАН. Пушкино. 2016. С.116-117.