

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Евстигнеева Стелла Сергеевна

**ГЛИКОПОЛИМЕРЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ
ПОЛИСАХАРИДЫ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*
В АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ СУЩЕСТВОВАНИЯ**

Специальность: 1.5.11. – Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Федоненко Юлия Петровна

Саратов – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Бактерии рода <i>Azospirillum</i> как представители группы ризобактерий, стимулирующих рост и развитие растений.....	14
1.1.1 Общие сведения о представителях рода <i>Azospirillum</i>	15
1.1.2 Ростстимулирующая активность бактерий рода <i>Azospirillum</i>	17
1.2 Основные этапы ассоциативного взаимодействия растений и бактерий рода <i>Azospirillum</i>	21
1.2.1 Хемотаксис как первый этап растительно-микробного взаимодействия.....	21
1.2.2 Адсорбция бактерий рода <i>Azospirillum</i> на корнях растений.....	24
1.2.3 Особенности формирования биопленок бактериями <i>Azospirillum</i>	32
1.3 Ответные реакции бактерий рода <i>Azospirillum</i> на изменения условий культивирования.....	37
1.3.1 Природа источника углерода и соотношение источников углерода и азота в питательной среде.....	37
1.3.2 Осмотический стресс.....	42
1.3.3 Температурный стресс.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1 Бактериальные культуры, условия их выращивания и хранения.....	47
2.2 Приборы и материалы.....	49
2.3 Методы исследования.....	51
2.3.1 Микроскопические методы исследования.....	51
2.3.1.1 Фазово-контрастная микроскопия.....	51
2.3.1.2 Конфокальная микроскопия.....	51
2.3.2 Определение относительной гидрофобности поверхности бактериальных клеток.....	52
2.3.3 Количественная оценка агрегации бактериальных культур.....	52
2.3.4 Выделение и очистка экстраклеточных и мембранных	53

гликополимеров бактерий.....	
2.3.4.1	Получение экзополисахаридов и капсульных полисахаридов..... 53
2.3.4.2	Выделение экстраклеточного полимерного матрикса биопленок..... 54
2.3.4.3	Экстракция липополисахаридов из внешней мембраны бактерий..... 54
2.3.4.4	Деградация гликополимеров и получение O-специфических полисахаридов..... 55
2.3.5	Хроматографические методы..... 55
2.3.5.1	Гель-фильтрация..... 55
2.3.5.2	Газожидкостная хроматография..... 56
2.3.6	Колориметрические методы..... 57
2.3.7	Электрофорез в полиакриламидном геле..... 57
2.3.8	ЯМР-спектроскопия..... 58
2.3.9	Масс-спектрометрия..... 58
2.3.10	Биоинформатический анализ..... 59
2.3.11	3D-моделирование..... 60
2.3.12	Оценка способности белков к образованию амилоидов..... 61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..... 62	
3.1	Характеристика структуры ЛПБК из КПС бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245.... 62
3.1.1	Анализ структуры ПС, выделенного из ЛПБК капсулы бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245..... 63
3.1.2	Характеристика белков в ЛПБК бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245..... 67
3.2	Исследование влияния условий культивирования на структуру экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245..... 81
3.2.1	Влияние источника углерода в среде культивирования и фазы роста на структурные особенности КПС и ЛПС <i>A. baldaniorum</i> Sp245..... 81
3.2.2	Структура и свойства ЭПС, КПС и ЛПС бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245 при культивировании в условиях температурного и солевого

стрессов.....	
3.3 Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок <i>A. baldaniorum</i> Sp245 и <i>A. halopraeferens</i> Au4.....	104
3.3.1 Характеристика биопленок и состава углеводных компонентов матрикса и поверхности клеток бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245.....	104
3.3.2 Структура гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий <i>A. halopraeferens</i> Au4.....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	116
ВЫВОДЫ.....	120
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	161
БЛАГОДАРНОСТИ.....	165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Среди наиболее важных обитателей ризосферы, которые участвуют в образовании растительно-микробных ассоциаций, выделяют представителей рода *Azospirillum*. Данные бактерии, встречающиеся в почвах большинства климатических зон, выступают в качестве ключевого компонента различных агроэкосистем, в составе которых они формируют взаимовыгодные связи с культурными и сорными растениями (Kirchhof *et al.*, 1997; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Увеличение урожайности злаков независимо от типа почв и погодно-климатических условий является важной задачей для мирового сельского хозяйства, решить которую помогут микробные удобрения, в том числе на основе азоспирилл, с условием всестороннего изучения их адаптационного потенциала.

Эффективность внесения бактерий в составе биоудобрений в почву определяется успешностью первых этапов колонизации корневой системы растений (Skvortsov and Ignatov, 1998). Со стороны азоспирилл на начальных этапах становления ассоциативных отношений принимают участие экзополисахариды (ЭПС), капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды внешней мембраны (ЛПС). Несмотря на важные функции, которые выполняют КПС в ходе жизнедеятельности бактерий, структура липополисахарид-белкового (ЛПБК) и полисахарид-липидного (ПСЛК) комплексов, выделенных из капсулы, определена только для типового штамма *A. lipoferum* Sp59b (Смолькина и др., 2010). Такая существенная недоработка при исследовании молекулярного диалога азоспирилл с растениями, вероятно, связана со сложным составом капсульных биополимеров и их изменчивостью, которая помогает бактериям приспособливаться к различным условиям среды обитания.

Изучение закономерностей изменчивости углеводных компонентов поверхности бактерий рода *Azospirillum* имеет первостепенное значение для установления особенностей формирования растительно-микробных ассоциаций с учетом влияния стрессовых факторов. Оптимизация ассоциативных отношений азоспирилл и растений невозможна без знаний об адаптивном ответе гликанов поверхности бактерий и их внеклеточных форм на такие воздействия как, природа источника углерода и концентрация хлорида натрия в среде, фаза роста и температура.

Бактерии рода *Azospirillum* способны перерабатывать различные субстраты, находящиеся в ризосфере, и использовать их как источник углерода. В частности, азоспириллы утилизируют низкомолекулярные органические кислоты и углеводы (Westby *et al.*, 1983; Myers and Hubbell, 1987). Тем не менее, в литературных источниках обнаружено недостаточно сведений об эффектах, оказываемых доминирующими источниками углерода в ризосфере растений-партнеров с различающимися путями фотосинтеза на структуру и химический состав гликанов бактерий *Azospirillum*. Основным источником углерода в селективных синтетических средах, с помощью которых осуществляют культивирование азоспирилл, является малат натрия. Это обусловлено тем, что в состав корневых экссудатов растений входят органические кислоты, причем они являются преобладающими компонентами данных корневых выделений. Одной из наиболее часто встречающихся органических кислот в экссудатах пшеницы и ряда других злаков является яблочная кислота (Кравченко и др., 2011). Тем не менее, в работе (Das and Mishra, 1983) было показано, что культивирование бактерий *A. brasilense* в среде, содержащей фруктозу в качестве источника углерода, не снижало продукцию клеточной биомассы, если сравнивать с ростом азоспирилл в среде с малатом натрия. Кроме того, выращивание данных бактерий во фруктозо-содержащей среде усиливало процесс фиксации азота (Das and Mishra, 1983). Синтетические среды, включающие фруктозу и нитрат калия в качестве источников углерода и азота, соответственно, могут быть использованы для получения культур бактерий рода *Azospirillum* с повышенной флокуляцией (Sadasivan and Neura, 1985). Флокулирующие культуры имеют важное прикладное значение для агробиотехнологии при обработке сельскохозяйственных растений. В работе (Егоренкова и др., 2000) было обнаружено влияние фазы роста азоспирилл на адсорбцию к поверхности корней растений, что указывает на возникновение модификаций в структуре гликанов внешней мембраны, либо на перераспределение их состава на поверхности клеток. Поскольку процесс адсорбции имеет определяющую роль на первых этапах образования растительно-бактериального консорциума, необходимо провести изучение влияния отличных по природе источников углерода в питательной среде на ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *Azospirillum* на разных фазах роста.

К широкому набору воздействий, с которыми сталкиваются азоспириллы в ходе жизнедеятельности в ризосфере, можно отнести перепады температуры и повышенную

концентрацию солей в почве. Тем не менее, сведения об адаптационных механизмах к этим стрессорам и степени вовлеченности в них компонентов поверхности бактерий носят фрагментарный характер. Известно лишь, что при кратковременном воздействии повышенных температур протекторную роль у бактерий *A. brasilense* выполняют экстраклеточные гликаны (Коннова и др., 2001), а в процессе адаптации к солевому стрессу у типового штамма *A. brasilense* Sp7 происходит индукция ряда генов, контролирующих синтез компонентов клеточной поверхности (Nagarajan *et al.*, 2007). Расширение представлений о защитных реакциях бактерий рода *Azospirillum* к температурному и солевому стрессам, а также об участии в них гликополимеров поверхности клеток и их экстраклеточных форм, может быть использовано для оптимизации состава биопрепаратов на их основе.

Бактерии рода *Azospirillum* при колонизации растений формируют на поверхности корней пространственно и метаболически организованные сообщества, называемые биопленками. В ряде работ были исследованы особенности формирования биопленок штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (ранее штамм *A. brasilense* Sp245, реклассифицирован согласно работе Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020) и его мутантами по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1*, а также *flhB1* мутанта, лишённого полярного и латерального жгутиков, на гидрофильной и гидрофобной поверхностях (Шелудько и др., 2015; Шумилова и др., 2016). Также для *A. baldaniorum* Sp245 и его производных было продемонстрировано влияние мутаций в генах синтеза ЛПС и полисахаридов (ПС), связывающих калькофлюор, на толщину биопленок, образованных на границе раздела «жидкость–твёрдая гидрофильная/гидрофобная поверхность» (Шелудько и др., 2008). Данный факт указывает на важную роль, которую выполняют гликополимеры поверхности при биопленкообразовании, однако вопросы о том изменяется ли структура этих биополимеров при переходе от планктонного культивирования к иммобилизации в биопленках, и как эти модификации могут влиять на колонизацию растений, остаются открытыми. На сегодняшний день для азоспирилл также практически не изучен состав внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) как основного структурного компонента биопленок.

Фундаментальные знания о роли гликополимеров поверхности и их экстраклеточных форм в защитных реакциях азоспирилл на стрессовые воздействия, а также в иммобилизации бактерий в случае образования биопленок, внесут

существенный вклад в разработку эффективных микробных удобрений с широким спектром применения.

Цель работы – охарактеризовать структуру гликополимеров внешней мембраны и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* при адаптации к условиям существования. Для реализации цели в ходе исследования решали следующие задачи:

1. Установить структуру липополисахарид-белкового комплекса капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при выращивании в селективной питательной среде с малатом натрия.
2. Оценить влияние природы источника углерода в среде культивирования и фазы роста на состав и структуру капсульных полисахаридов и липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245.
3. Изучить влияние температурного и солевого стрессов на особенности структуры экзополисахаридов, капсульных полисахаридов и липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245.
4. Провести характеристику структуры гликополимеров в составе внеклеточного полимерного матрикса, формируемого биопленками бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4.

Научная новизна работы. Установлена структура углеводного компонента ЛПБК, полученного из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Впервые были выделены и идентифицированы белки, входящие в состав ЛПБК капсулы *A. baldaniorum* Sp245 – основной белок наружной мембраны OmaA и OmpW-подобный белок.

Выявлены изменения состава и структуры ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при варьировании условий культивирования (природы источника углерода и концентрации хлорида натрия в питательной среде, фазы роста и температуры). Определена структура дополнительного ПС, который синтезировался в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактериями *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов.

Впервые были выделены и охарактеризованы ЛПС и ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Установлено, что при переходе от планктонного культивирования к образованию биопленок бактерии *A. halopraeferens*

Au4 продуцируют дополнительный глюкан в ЛПС. В составе ВПМ биопленок исследуемых штаммов преобладали белки в широком диапазоне молекулярных масс ~20-80 кДа. Углеводная фракция ВПМ была представлена молекулами ЛПС, а также синтезированным *de novo* гомоглюканом в случае галотолерантного штамма.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты настоящей работы имеют фундаментальное значение для выяснения закономерностей адаптации почвенных бактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также роли в адаптации экстраклеточных и мембранных гликополимеров ассоциативных бактерий. Учитывая, что стимулирующие рост и развитие растений бактерии рода *Azospirillum* могут быть использованы для создания экологически безопасных комплексных биоудобрений, полученные данные помогут оптимизировать применение таких биопрепаратов в различных климатических и почвенных условиях. Выбранные для исследования штаммы образуют ассоциации с ценным для сельского хозяйства зерновыми и кормовыми культурами, распространенными как на территории Российской Федерации, так и за рубежом.

Препараты экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4, выращенных при различных условиях, используются при выполнении плановых НИР в рамках лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

Результаты настоящей работы, применяются студентами бакалаврами и магистрами Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского (СГУ) при подготовке выпускных квалификационных работ.

Научно-методические подходы, которые были разработаны при выполнении диссертационного исследования, включены в учебное пособие «Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений» / Сост.: Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Телешева Е.М., Дятлова Ю.А., Шелудько А.В., Широков А.А., Матора Л.Ю., Тугарова А.В., Камнев А.А., Филипьева Ю.А., Петрова Л.П.; Под ред. Ю.П. Федоненко; Саратов, 2021; 40 с., рекомендованное к публикации на заседании Ученого совета ИБФРМ РАН.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы согласовывалась с поставленной целью и соответствовала решаемым задачам. Предметом данного исследования являлись гликополимеры внешней мембраны и полисахариды поверхности бактерий рода *Azospirillum*. В качестве теоретической основы для проведенных экспериментов выступали научные труды российских и зарубежных коллег. В диссертационном исследовании использовали микробиологические, физико-химические, биохимические, биоинформатические и иммунохимические методы. Полученные в ходе работы результаты регистрировались и обрабатывались с использованием статистических методов анализа.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Липополисахарид-белковый комплекс, продуцируемый бактериями *A. baldaniorum* Sp245 в капсульный материал, характеризуется сходным профилем жирных кислот и идентичной структурой полисахаридного компонента с гомологичным липополисахаридом внешней мембраны, а также наличием двух белков – порина OmsA и канал-образующего OmpW-подобного белка.

2. Использование различных источников углерода, варьирование концентрации хлорида натрия в питательной среде, увеличение температуры и продолжительности культивирования бактерий *A. baldaniorum* Sp245 сопровождается изменениями в макромолекулярной организации, моносахаридном и жирнокислотном составех экзополисахаридов, капсульных полисахаридов и липополисахаридов. Индукция биосинтеза глюкана, дополнительного полисахарида в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров азоспирилл, является ответной реакцией на воздействие стрессовых факторов различной природы.

3. В составе многокомпонентного внеклеточного полимерного матрикса биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 преобладают белки (до 80%) с широким диапазоном молекулярных масс, а гликополимерная составляющая представлена липополисахаридом (до 20%). При образовании биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 продуцируют дополнительный гомоглюкан в составе липополисахарида внешней мембраны и матрикса.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается применением современных методов анализа, получением достаточного количества опытных данных, их согласованности с

теоретическими выкладками, использованием статистических методов обработки и сертифицированного оборудования, прошедшего метрологическую поверку. Выводы, сформулированные по итогам данной работы, имеют четкое экспериментальное обоснование.

Результаты, изложенные в данной диссертационной работе, были представлены на 2-ой Международной междисциплинарной научной конференции «Адаптационные стратегии живых систем» (12-17 мая 2014, Новый Свет, Украина); II, III и IV Всероссийских конференциях «Фундаментальная гликобиология» (7-11 июля 2014, Саратов; 7-12 сентября 2016, Владивосток; 23-28 сентября 2018, Киров); VII Всероссийском конгрессе молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014» (6-11 октября 2014, Екатеринбург); X молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (27-30 октября 2015, Москва); VIII и IX Всероссийских конференциях молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (26-30 сентября 2016; 14-18 октября 2019, Саратов); X Всероссийском конгрессе молодых биологов «Симбиоз-Россия 2017» (25-28 октября 2017, Казань); Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (13-17 июня 2018, Уфа); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2018», посвященной 131-годовщине со дня рождения Н.И. Вавилова (28-29 ноября 2018, Саратов); IV Съезде биохимиков России, проходившего в рамках II Объединенного научного форума (1-6 октября 2019, Дагомыс, Сочи).

Устный доклад на тему «Особенности состава и структуры гликополимеров поверхности и матрикса биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245» в секции «Экология, физиология и биотехнология микроорганизмов и грибов» VII Всероссийского Конгресса «Симбиоз-Россия 2014» (Екатеринбург, 2014) был удостоен диплома I степени. Устный доклад на тему «Бактериальный «социум» биопленок или особенности организации микробных сообществ ризосферы» по итогам конкурса работ молодых ученых на IX Всероссийской конференции «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2019) был удостоен диплома III степени.

Личный вклад соискателя. Автор диссертационной работы принимал участие в планировании и проведении экспериментальных работ, обсуждении полученных

результатов, формулировании выводов и основных положений, а также в написании публикаций. Выращивание бактериальных культур, выделение, очистка и характеристика препаратов экстраклеточных и мембранных гликополимеров, а также О-специфических полисахаридов (ОПС) проводились автором лично.

Публикации. По теме диссертации подготовлено 17 публикаций в российских и зарубежных научных изданиях, из которых 6 статей в журналах, которые рекомендованы ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований.

Работа выполнена в соответствии с темой НИР лаборатории биохимии ИБФРМ РАН «Роль биомакромолекул и низкомолекулярных веществ в механизмах адаптации растительно-микробных ассоциаций в составе антропобиоценозов к условиям аридного климата» (2013-2017 гг. № госрегистрации 01201359049, рук. – проф., д.б.н. В.В. Игнатов) и плановой темой НИР лаборатории биохимии и лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (2018-2020 гг. № госрегистрации АААА-А19-119011890162-3, рук. – к.б.н. Ю.П. Федоненко). Определение структуры ПС с применением спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) осуществляли совместно с сотрудниками лаборатории химии углеводов Института органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва).

Диссертационная работа на всех этапах была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований: «Исследование структурных особенностей липополисахаридов и их роли в формировании симбиотического фенотипа ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* при существовании в стрессовых условиях» 2014-2016 гг., №14-04-01658, рук. – проф., д.б.н. В.В. Игнатов; «Структурно-функциональные особенности мембранных и внеклеточных углеводсодержащих полимеров почвенных бактерий в условиях антропогенной контаминации» 2015-2016 гг., №15-04-00353, рук. – к.б.н. Ю.П. Федоненко; «Структурные исследования гликополимеров поверхности клеток флокулирующих культур и биопленок бактерий рода *Azospirillum*» 2018-2020 гг., №18-34-00089, рук. – С.С. Евстигнеева.

Объем и структура диссертации. Диссертация включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, состоящую из изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и списка используемой литературы, который содержит 317 источников, из которых 54 источника на русском языке. Работа представлена на 165 страницах, в качестве иллюстративного материала содержит 23 рисунка и 16 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Бактерии рода *Azospirillum* как представители группы ризобактерий, стимулирующих рост и развитие растений

Ежегодно по всему миру в почву вносится около 60 млн. т азота, фосфора и калия в виде минеральных удобрений. Такое избыточное поступление в почву неорганических соединений приводит к их накоплению в грунтовых водах, отрицательно влияет на состояние микробного сообщества почвы, вызывает нитратное загрязнение кормов и продуктов питания, а также негативно сказывается на здоровье животных и человека. Альтернативой химизации сельского хозяйства является использование экологически чистых бактериальных удобрений. Такие микробные биопрепараты содержат монокультуры или комплекс микроорганизмов, которые способствуют накоплению в почве элементов питания растений, повышающих их рост и урожайность (Vejan *et al.*, 2016; Martínez-Hidalgo *et al.*, 2019).

Микробные биопрепараты, в состав которых входят ассоциативные ризобактерии, стимулирующие рост и развитие растений (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR) не проявляют высокую избирательность к растению-партнеру и могут быть применены для обширного круга злаковых культур. Однако, сведения об эффективности подобных биоудобрений на основе PGPR в подавляющем большинстве относятся к определенному сорту растений. Данный факт накладывает существенные ограничения на применение бактерий группы PGPR в качестве биотехнологически значимых компонентов биопрепаратов. Дальнейшие перспективы использования данных ризобактерий могут быть связаны с поиском новых видов и штаммов, в наибольшей степени удовлетворяющим ассоциативным характеристикам широкого спектра сельскохозяйственных культур, с которыми они образуют устойчивые взаимовыгодные отношения, вне зависимости от условий окружающей среды (Aeron *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2019). На основании вышесказанного среди наиболее многообещающих компонентов микробных удобрений следует отметить бактерии рода *Azospirillum*, которые могут формировать эффективные ассоциации с возделываемыми и дикорастущими растениями (Bashan and de-Bashan, 2010; Pereg *et al.*, 2016).

1.1.1 Общие сведения о представителях рода *Azospirillum*

Бактерии рода *Azospirillum* принадлежат к семейству *Rhodospirillaceae* класса Alphaproteobacteria. Впервые азоспириллы были обнаружены в 1922 году Мартином Бейеринком в экспериментах по инокуляции почвенных изолятов на средах с малатом и лактатом натрия и дефицитом азота. Первоначально данные бактерии были обозначены как *Azotobacter spirillum*, а спустя три года были вынесены в отдельный род *Spirillum* (Beijerinck, 1925). На протяжении шестидесяти лет diaзотрофы *Spirillum lipoferum* практически не исследовались (Becking, 1963). Однако, благодаря работам Джоан Доберейнер, направленным на изучение ризосферной микрофлоры злаковых растений (пшеницы, сорго, проса, кукурузы и т.д.), к середине 80-х годов прошлого века их начинают активно исследовать как с фундаментальной, так и с практической точки зрения (Döbereiner *et al.*, 1972; 1976). Подобные работы положили начало новому направлению в почвенной микробиологии – изучению молекулярных основ формирования и функционирования растительно-микробных ассоциаций (Döbereiner and Day, 1976). В дальнейшем с применением физиолого-биохимических и молекулярно-генетических подходов бактерии рода *Spirillum* были реклассифицированы как новый род *Azospirillum* (Tarrand *et al.*, 1978).

На данный момент внутри рода *Azospirillum* насчитывается 24 вида, которые были выделены из ризосферы растений семейства злаковые (*Poaceae*); из почв, отведенных под сельскохозяйственные угодья и загрязненных нефтепродуктами; из горячих источников, пресноводных водоемов и сфагновых болот; из ферментационной емкости, микробного топливного элемента и отработанного дорожного битума (Таблица 1). В отличие от других видов азоспирилл, бактерии *A. ramasamyi* (Anandham *et al.*, 2019), имели достаточно необычный источник выделения – ферментированные мясные продукты.

Таблица 1 – Видовое разнообразие бактерий рода *Azospirillum*

Типовой штамм	Источник выделения типовых штаммов (ссылка)
1	2
<i>A. brasilense</i> Sp7	ризосфера росички лежачей (<i>Digitaria decumbens</i> Stent.), Бразилия (Tarrand <i>et al.</i> , 1978)

Продолжение Таблицы 1

1	2
<i>A. lipoferum</i> Sp59b	ризосфера пшеницы обыкновенной (<i>Triticum vulgare</i> L.), Бразилия (Tarrand <i>et al.</i> , 1978)
<i>A. halopraeferens</i> Au4	ризоплана лептохлои темной (<i>Leptochloa fusca</i> L. Kunth), Пакистан (Reinhold <i>et al.</i> , 1987)
<i>A. largimobile</i> UQM 2041	вода пресноводных источников, Австралия (Skerman <i>et al.</i> , 1983; Ben Dekhil <i>et al.</i> , 1997)
<i>A. doebereineriae</i> GSF71	ризосфера веерника китайского (<i>Miscanthus sinensis</i> Andersson), Германия (Eckert <i>et al.</i> , 2001)
<i>A. oryzae</i> COC8	ризосфера риса посевного (<i>Oryza sativa</i> L.), Япония (Xie and Yokota, 2005)
<i>A. melinis</i> TMCY 0552	ризосфера паточной травы (<i>Melinis minutiflora</i> Beauv.), Китай (Peng <i>et al.</i> , 2006)
<i>A. canadense</i> DS2	ризосфера кукурузы сахарной (<i>Zea mays</i> L.), Канада (Mehnaz <i>et al.</i> , 2007a)
<i>A. zaeae</i> N7	ризосфера кукурузы сахарной (<i>Zea mays</i> L.), Канада (Mehnaz <i>et al.</i> , 2007b)
<i>A. rugosum</i> AFH-6	загрязненная нефтепродуктами почва округа Гаосюн, Тайвань (Young <i>et al.</i> , 2008)
<i>A. picis</i> TAR-3	отработанный дорожный битум, Китай (Lin <i>et al.</i> , 2009)
<i>A. palatum</i> WW 10	лесная почва провинции Чжэцзян, Китай (Zhou <i>et al.</i> , 2009)
<i>A. thiophilum</i> BV-S	бактериальный мат одного из сероводородных источников Северного Кавказа, Россия (Lavrinenko <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. formosense</i> CC-Nfb-7	сельскохозяйственные угодья уезда Юньлинь, Тайвань (Lin <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. fermentarium</i> CC-LY743	ферментационная емкость, Тайвань (Lin <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. humicireducens</i> SgZ-5	микробный топливный элемент, Китай (Zhou <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. soli</i> CC-LY788	сельскохозяйственные угодья уезда Юньлинь, Тайвань (Lin <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. agricola</i> CC-HIH038	сельскохозяйственные угодья округа Уфэн, Тайчжун, Тайвань (Lin <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. griseum</i> L-25-5 w-1	вода озера Байяндянь в провинции Хэбэй, Китай (Yang <i>et al.</i> , 2019)

Окончание Таблицы 1

1	2
<i>A. palustre</i> B2	сфагновое болото в Тверской области, Россия (Tikhonova <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. ramasamyi</i> M2T2B2	ферментированные мясные продукты, Республика Корея (Anandham <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. thermophilum</i> CFH 70021	почва горячего источника близ города Тэнчун провинции Юньнань, Китай (Zhao <i>et al.</i> , 2020)
<i>A. baldaniorum</i> Sp245	поверхностно стерилизованные корни пшеницы (<i>Triticum</i> sp.), Бразилия (Dos Santos Ferreira <i>et al.</i> , 2020)
<i>A. oleiclasticum</i> RWY-5-1-1	смесь отобранных нефтепродуктов из нефтяного месторождения Юмень, Китай (Wu <i>et al.</i> , 2021)

Клетки бактерий рода *Azospirillum* имеют форму изогнутых палочек, обладающих диаметром в среднем 0.9 мкм и длиной не более 5 мкм (Bashan *et al.*, 2004; Saikia *et al.*, 2012). В зависимости от условий выращивания и состава питательной среды азоспириллы могут менять форму клеток и становиться округлыми, вибриодными или палочковидными.

1.1.2 Ростстимулирующая активность бактерий рода *Azospirillum*

Бактерии рода *Azospirillum* стимулируют рост и развитие растений, благодаря ряду ключевых свойств, таких как фиксация атмосферного азота, денитрификация, солюбилизация соединений фосфора, продукция биологически активных веществ, в том числе, фитогормонов, витаминов и т.п., изменение проницаемости и эластичности клеточных стенок растений, подавление роста фитопатогенных бактерий и грибов, и т.д. (Bashan and de-Bashan, 2010).

Бактерии *Azospirillum* способны фиксировать азот атмосферы, снабжая своих растений-партнеров жизненно важным элементом в легко усвояемой форме. Фиксация азота бактериями *Azospirillum* была показана как в чистой культуре (Окон, 1985), так и в многократных экспериментах *in vivo* при инокуляции с растениями (Sraeren *et al.*, 2009;

Bashan and de-Bashan, 2010). В клетках азоспирилл присутствует нитрогеназа – мультифермент, осуществляющий процесс фиксации азота и состоящий из динитрогеназы (Mo-Fe-белка) и редуктазы динитрогеназы (Fe-белка). Активность нитрогеназного комплекса у *A. brasilense* зависит от присутствия ионов аммония (NH_4^+) и кислорода (O_2) в окружающей среде (Pedrosa and Elmerich, 2007). Для защиты ферментов нитрогеназного комплекса от повреждающего действия молекулярного кислорода данные бактерии продуцируют различные антиоксиданты, в том числе каротиноиды (Thirunavukkarasu *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2011). Транскрипция генов азотфиксации (*nif*) в случае diaзотрофов, относящихся к протеобактериям, обычно активируется белком NifA. В случае азоспирилл активность белка NifA контролируется сигнальными белками семейства PII (GlnB и GlnZ) в ответ на колебания уровня NH_4^+ . Нитрогеназная активность *A. brasilense in vivo* также обратимо инактивируется ионами NH_4^+ , что сопровождается «включением» фермента АДФ-рибозилтрансферазы (DraT), катализирующего модификацию PII-трансдукторов. Наоборот, при дефиците ионов NH_4^+ в среде активируется фермент АДФ-рибозилгликогидролаза (DraG), возвращающий сигнальным белкам прежнюю активную конформацию (Cassán and García de Salamone, 2008; Huergo *et al.*, 2009).

Азоспириллы помимо фиксации атмосферного азота обладают также рядом свойств, которые позволяют им формировать устойчивые растительно-бактериальные консорциумы независимо от воздействий окружающей среды. К одному из подобных свойств относят продукцию фитогормонов, таких как ауксины, в частности индолил-3-уксусная кислота (Cassán *et al.*, 2014), этилен (Strzelczyk *et al.*, 1994), гиббереллины (Bottini *et al.*, 1989), цитокинины, в том числе кинетин и зеатин (Tien *et al.*, 1979), а также абсцизовая (Cohen *et al.*, 2008) и салициловая (Sahoo *et al.*, 2014) кислоты. Экскретируемые азоспириллами фитогормоны вызывают интенсивный рост корней растений, их удлинение и ветвление, а также увеличение количества корневых волосков (Kapulnik *et al.*, 1985; Fallik *et al.*, 1994). Перечисленные эффекты способствуют улучшению минерального питания растений (Lin *et al.*, 1983; Sarig *et al.*, 1988) и, в тоже время, увеличению числа потенциальных сайтов для последующей колонизации и инвазии (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000).

Помимо фитогормонов бактерии *Azospirillum* выделяют в окружающую среду витамины (тиамин, рибофлавин и т.д.) (Dahm *et al.*, 1993; Rodelas *et al.*, 1993),

полиамины (путресцин, спермидин, спермин и кадаверин), аминокислоты (глутаминовая кислота, серин, аланин и т.д.) (Thuler *et al.*, 2003; Perrig *et al.*, 2007) и сидерофоры (Saxena *et al.*, 1986). Сидерофоры представляют собой низкомолекулярные соединения различной химической природы, эффективно связывающие железо. Данные вещества позволяют бактериям, которые их выделяют, восполнять свои потребности в железосодержащих метаболитах, а также ингибировать фитопатогенную микрофлору путем снижения доступности железа в среде (Bar-Ness *et al.*, 1991). Так, например, штаммы *A. brasilense* REC2 и REC3 секретируют сидерофоры катехолового типа, обладающие антифунгицидной активностью в отношении гриба *Colletotrichum acutatum*, который вызывает антракноз земляники (Tortora *et al.*, 2011). Подобные сведения указывают на возможность применения азоспирилл в качестве агентов биоконтроля различных фитопатогенных возбудителей.

Важной особенностью азоспирилл также является способность солюбилизовать малодоступные для растений формы фосфатов из органических и неорганических источников в подвижные и легкоусвояемые для них соединения (Turan *et al.*, 2012).

Бактерии *Azospirillum* обладают деструктивной активностью в отношении ксенобиотиков, в частности нефтяных углеводородов (Турковская и Муратова, 2005; Gao *et al.*, 2015). Так, было показано, что штамм *A. brasilense* SR80 разрушал сырую нефть при культивировании в среде с малатом натрия в качестве дополнительного источника углерода и энергии. Кроме того, наличие нефти в среде не влияло на продукцию данным штаммом индолил-3-уксусной кислоты. В условиях гидропоники бактерии *A. brasilense* SR80 не только деградировали сырую нефть, но и вступали в ассоциативные отношения с пшеницей (Муратова и др., 2005). Представители рода *Azospirillum*, как деструкторы нефти и прочих ксенобиотиков, являются незаменимыми компонентами микробных препаратов, поскольку их применение для активации роста и развития растений возможно на почвах, подвергшихся различного рода загрязнениям.

Азоспириллы в растительно-микробных ассоциациях не только помогают макропартнерам повышать урожайность, но и наделяют их устойчивостью к различным биотическим и абиотическим стрессам. В случае воздействия на растения патогенов бактерии *Azospirillum* индуцируют их системную резистентность (Fukami *et al.*, 2018a). Данный тип устойчивости можно назвать «неинфекционным иммунитетом», поскольку растения, не имея ранее контакта с патогенными бактериями или грибами, приобретают

устойчивость к заражению. Механизмы индуцированной системной резистентности опосредованы повышением уровней фитогормонов – этилена и жасмоновой кислоты, в то время как основные пути «инфекционного иммунитета» зависят от уровня салициловой кислоты. Этилен и жасмоновая кислота, либо жасмонат выступают в качестве сигнальных молекул, регулирующих синтез PR-белков (pathogenesis-related proteins) (van Loon and van Strien, 1999; Gond *et al.*, 2015). Среди PR-белков выделяют несколько семейств, различающихся по выполняемым функциям при защите растений от патогенов. Например, представители семейства PR-2 являются β -1,3-эндоглюканазами (Kauffmann *et al.*, 1987), ферменты семейств PR-3 и PR-4 относятся к группе хитиназ, белки PR-6 выступают в качестве ингибиторов протеиназ и т.д. (van Loon and van Strien, 1999). При инокуляции растений *Arabidopsis thaliana* штаммом *A. baldaniorum* Sp245 была выявлена индукция генов, ответственных за синтез PR-белков (Sraeren *et al.*, 2014). Аналогичные результаты были получены при выращивании кукурузы в присутствии *A. brasilense* Ab-V5 и Ab-V6 (Fukami *et al.*, 2017; 2018b).

В условиях абиотических стрессов бактерии группы PGPR, в том числе азоспириллы, способны активировать системную толерантность растений, механизмы которой связаны с включением антиоксидантной (Heidari and Golpayegani, 2012; Wang *et al.*, 2012) и осмотической (Sarma and Saikia, 2014) защиты, продукцией фитогормонов, в том числе ауксинов (Sraeren and Vanderleyden, 2015), экспрессией генов синтеза PR-белков (Kim *et al.*, 2014) и белков теплового шока (Lim and Kim, 2013). Так, при инокуляции семян твердой пшеницы (*Triticum durum* var. waha) штаммом *A. brasilense* NH (Nabti *et al.*, 2010) в условиях солевого стресса (160 и 200 мМ NaCl) было показано благоприятное воздействие бактерий на всхожесть семян и их урожайность, посредством снижения содержания пролина и ряда сахаров (Alamri and Mostafa, 2009). Также была продемонстрирована роль бактерий *Azospirillum* в обеспечении устойчивости растений к засухе (Saeed *et al.*, 2016; Curá *et al.*, 2017). Положительный эффект азоспирилл на макропартнеры обусловлен индукцией синтеза абсцизовой кислоты в растениях, вызывающей закрытие устьиц (Cohen *et al.*, 2015), и запасания свободных аминокислот и сахаров, которые помогают связывать воду. Данные бактерии также стимулируют ветвление и увеличение биомассы корней, возрастание плотности

корневых волосков, что способствует поиску воды в более глубоких слоях почвы (Lopes *et al.*, 2011; Hungria *et al.*, 2015).

Несмотря на многочисленные работы, посвященные особенностям взаимодействия растений и бактерий рода *Azospirillum*, на данный момент механизм функционирования таких растительно-микробных ассоциаций полностью не установлен. Особое внимание в исследованиях системы «азоспирилла-растение» должно быть уделено заселению и колонизации корней, как ключевым этапам становления устойчивых ассоциаций.

1.2 Основные этапы ассоциативного взаимодействия растений и бактерий рода *Azospirillum*

Бактерии *Azospirillum* заселяют как поверхность, так и внутренние ткани корней дикорастущих и культурных растений и являются примером факультативных эндофитов (Döbereiner and Baldani, 1982). Ассоциативное взаимодействие бактерий *Azospirillum* как представителей группы PGPR с макропартнерами упрощенно включает в себя три основных этапа: хемотаксис к корням растений, адсорбцию на их поверхности, а также формирование микроколоний и биопленок (Del Gallo and Fendrik, 1994).

1.2.1 Хемотаксис как первый этап растительно-микробного взаимодействия

На первом этапе ассоциативного взаимодействия бактерии движутся к растению, благодаря таксису к химическим аттрактантам корневых экссудатов, в качестве которых выступают неспецифические и специфические молекулы различной природы (Okon and Karulnik, 1986). Экссудаты растений содержат дисахариды (сахароза) и моносахариды (фруктоза, глюкоза, ксилоза и т.д.), органические кислоты (яблочная, лимонная, молочная, янтарная и пировиноградная кислоты), а также аминокислоты, биогенные амины, белки и вещества пептидной природы, в частности, ферменты, выступающие в

качестве модификаторов токсичных для растений веществ (Castro-Sowinski *et al.*, 2007). Данные вещества попадают в почву в результате секреции, автолиза клеток, слущивающихся с поверхности корня, а также в составе выделяемого корнями муцигеля, растворяются в воде и становятся доступными для ризобактерий (Alexandre *et al.*, 2000). Превалирующими компонентами корневых экссудатов являются органические кислоты, содержание которых составляет более 80%, в то время как содержание моносахаридов и дисахаридов возрастает по мере роста и развития растений (Kamilova *et al.*, 2006). Бактерии группы PGPR в ходе эволюции адаптировались к спектру метаболитов, продуцируемых растением-партнером в почву независимо от фазы роста и физиологического состояния (Herschkovitz *et al.*, 2005).

Для осуществления бактериями хемотаксиса требуется не только присутствие аттрактантов в микроокружении, но и наличие подвижных бактериальных клеток. Все описанные виды азоспирилл, за исключением *A. melinis*, снабжены двигательной органеллой – одиночным полярным жгутиком (Fla), вращение которого обеспечивает быстрое плавание бактерий в жидких средах. Некоторые виды азоспирилл, включая *A. brasilense*, имеют мало распространенный среди бактерий смешанный тип жгутикования. При росте на полужидких (содержание агар-агара составляет $\geq 0.4\%$) и плотных средах на клетках появляются многочисленные латеральные жгутики (Laf), используемые при роении (Moens *et al.*, 1995; 1996). Полужидкие питательные среды моделируют муцигель поверхности корней, в связи с чем, они часто применяются для исследования различных типов бактериальной подвижности, наиболее значимых для эффективной колонизации растений. Вместо Fla бактерии *Azospirillum* могут образовывать на одном из клеточных полюсов пили (Vfp) (Шелудько и Кацы, 2001), ответственные за «тянущий» тип подвижности (Шелудько и др., 2006). Образование Fla или Vfp, возможно, является альтернативным состоянием бактерий *A. brasilense*, поскольку не было обнаружено одновременно Fla и Vfp на одной и той же клетке (Шелудько и Кацы, 2001). Можно заключить, что азоспириллы способны к двум типам коллективного распространения в полужидких средах.

В основе хемотаксиса находятся системы трансдукции сигнала, которые позволяют клеткам реагировать на определенные изменения параметров среды, выполнив соответствующие клеточные ответы, посредством регуляции экспрессии генов. В геноме бактерий *A. brasilense* присутствуют четыре оперона хемотаксиса, три

из которых (*che1*, *che2* и *che3*) также присутствуют в геномах других видов азоспирилл (Mukherjee *et al.*, 2016).

Che1 путь хемотаксиса азоспирилл регулирует кратковременное увеличение скорости движения бактерий в ответ на различные аттрактанты (Bible *et al.*, 2012). У бактерий *A. brasilense*, также как в случае *Escherichia coli*, система трансдукции Che1 состоит из пяти белков (CheA, CheW, CheY, CheB и CheR) и нескольких метил-акцепторов, выполняющих роль хеморецепторов (Wadhams and Armitage, 2004). В работе Stephens *et al.* (2006) было показано, что белки CheB и CheR помимо хемотаксиса, также участвуют в аэротаксисе, однако, они не являются для данных процессов определяющими.

Ранее у *A. brasilense* был идентифицирован ген *chsA*, продукт которого, белок ChsA, является сигнальным протеином и важным компонентом передачи сигналов хемотаксиса. Мутант, дефектный по данному гену, был менее подвижен, чем родительский штамм, и характеризовался слабо выраженным хемотаксономическим ответом на различные аттрактанты (Carreño-López *et al.*, 2009).

Роль *che2* оперона у *A. brasilense* пока неизвестна, однако он является гомологом оперона *che2*, контролирующего биосинтез жгутиков у бактерий *Rhodospirillum centenum* (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011). Оперон *che3* *A. brasilense* ответственен за синтез белков, образующих хемотаксис-подобный путь, который задействован в контроле межклеточных взаимодействий и флокуляции (Bible *et al.*, 2015). Оперон *che4* присутствует в геномах азоспирилл и играет ключевую роль в реакциях хемотаксиса, а также необходим для конкурентной колонизации корней растений. Предполагается, что Che1 и Che4 пути трансдукции сигнала интегрируются во время хемотаксиса для получения усиленного ответа на аттрактанты. Такой механизм, с помощью которого подвижные бактерии используют одновременно два пути регуляции хемотаксономических реакций, ответственных за различные аспекты передвижения, вероятно, помогает увеличить шансы бактерий *Azospirillum* на колонизацию корней растений.

1.2.2 Адсорбция бактерий рода *Azospirillum* на корнях растений

Стимулирующий эффект бактерий группы PGPR по отношению к растениям непосредственно зависит от успешности процесса адсорбции клеток на корнях. Прикрепление бактерий *Azospirillum*, как и других представителей группы PGPR, к корневой поверхности состоит из двух основных фаз (Michiels *et al.*, 1991; Vande Broek and Vanderleyden, 1995). Первая фаза состоит из «обратимой» адгезии, в ходе которой единичные бактериальные клетки за счет неспецифических межмолекулярных взаимодействий начинают заселять корневую систему растений. Далее следует фаза «необратимой» адгезии или «заякоривания», в результате которой бактерии, благодаря специфическим взаимодействиям различной природы, прочно закрепляются на корнях. В реализации механизмов адсорбции, как на первой, так и на второй фазах, задействованы двигательные органеллы, поверхностно локализованные белки, а также экстраклеточные и мембранные гликаны (Michiels *et al.*, 1991; Del Gallo and Fendrik, 1994; Skvortsov and Ignatov, 1998).

Органоиды движения азоспирилл нередко обеспечивают физический контакт бактерий с поверхностью корней при формировании взаимовыгодных ассоциаций с растениями, выступая в роли адгезинов. Fla данных бактерий принимает активное участие в реализации молекулярных механизмов адсорбции. Так, при исследовании неподвижного мутанта типового штамма *A. brasilense* Sp7, который обладал резко сниженной адсорбционной способностью в отношении корней пшеницы, была показана ключевая роль Fla на первых этапах заселения растений (Croes *et al.*, 1993). Неподвижные в жидкостях и нероящиеся мутанты эндوفитного штамма *A. baldaniorum* Sp245, лишенные Fla, показали сниженную способность к адгезии и адсорбции на корнях пшеницы. Однако, в ходе фазы прочного прикрепления данные мутанты заселяют корни с той же эффективностью, что и родительский штамм (Шелудько и др., 2010).

Основным структурным элементом жгутика азоспирилл является гликопротеин флагеллин с молекулярной массой приблизительно 100 кДа (Moens *et al.*, 1995). В случае бактерий *A. brasilense* Sp7 была установлена структура O-связанного ПС, гликозилирующего флагеллин. Данный гликан, состоит из двенадцати повторяющихся

звеньев, состоящих из остатков следующих моносахаридов: L-рамнозы (L-Rha), D-галактозы (D-Gal), N-ацетилглюкозамина (D-GlcNAc) (основная цепь) и L-фукозы (L-Fuc) (боковая цепь) (Belyakov *et al.*, 2012). В составе ОПС данного штамма присутствует повторяющееся звено с аналогичной структурой (Sigida *et al.*, 2013). Сходство в строении О-антигена и углеводной цепи Н-антигена бактерий *A. brasilense* Sp7 может свидетельствовать о наличии нескольких возможных путей осуществления «молекулярного диалога» при заселении корней растений для увеличения его эффективности. Снаружи филамент жгутика покрыт полисахаридным чехлом, причем на примере *A. baldaniorum* Sp245 с применением ряда иммунохимических методов была выявлена антигенная идентичность компонентов чехла и ОПС, входящего в состав ЛПС данного штамма (Бурьгин и др., 2007). Возможно, чехол играет важную роль в опосредуемой Fla адсорбции азоспирилл на корневой поверхности (Croes *et al.*, 1993), что также способствует повышению шансов бактерий на успешную колонизацию и последующее формирование ассоциативных отношений.

В клеточной стенке бактерий рода *Azospirillum* присутствуют **лектины** непиллийного происхождения, которые представляют собой гликопротеины, обладающие способностью высокоспецифично связывать углеводные молекулы на поверхности клеток. Ранее были выделены лектины различных штаммов азоспирилл, различающиеся по углеводной специфичности (Никитина и др., 1994; 1996). Данные белки принимают непосредственное участие в узнавании бактериями корней растений и их колонизации (Castellanos *et al.*, 1998). Было показано, что бактерии *Azospirillum*, не проявляющие лектиновой активности значительно хуже адсорбируются на поверхности корней, нежели клетки, обладающие таковой (Никитина и др., 1996; Аленькина и др., 1998).

Исследование лектинов, выделенных из клеток штаммов Sp7 и Sp7.2.3, выявило их стимулирующее действие на растительные ферменты α -, β -глюкозидазы и β -галактозидазу при инкубации с тремя различными фракциями проростков пшеницы (экзокомпоненты, мембраны и апопласты), с наиболее выраженным эффектом в случае фракции экзокомпонентов (Аленькина и др., 2004). В дальнейшем было установлено, что лектины штаммов Sp7 и Sp7.2.3 воздействуют на сигнальные системы корней растений. В частности, данные белки увеличивали активность супероксиддисмутазы (НАДФН-оксидазная сигнальная система), липоксигеназы (липоксигеназная сигнальная

система) и синтазы оксида азота (NO-синтазная сигнальная система). Также лектины поддерживали определенный уровень свободной и связанной формы салициловой кислоты, посредством регуляции активности фермента фенилаланин-аммиак-лиазы, в случае мутантного штамма, и β -глюкозидазы, в случае родительского штамма (Аленькина и др., 2014).

Бактерии *A. brasilense* Sp7 способны продуцировать внеклеточные протеолитические ферменты, проявляющие активность в широком диапазоне pH, что вероятно, является одним из факторов, ответственных за выживание в неблагоприятных условиях среды. Также экстраклеточные протеиназы могут осуществлять протеолиз экстенсина – структурного белка срединной пластинки растительной клетки – на начальных этапах растительно-микробного взаимодействия. Предполагается, что литическая способность, проявляемая азоспириллами при инокуляции растения-хозяина, находится под контролем гомологичных лектинов или является одной из их функций (Чернышова и др., 2005).

ЭПС, продуцируемые бактериями *Azospirillum* в ходе жизнедеятельности, выполняют важную функцию в адгезии бактерий к различным поверхностям, в том числе к поверхности корней растений, а также в процессах, необходимых для выживания клеток как в свободноживущем состоянии, так и в составе ассоциации (Skvortsov and Ignatov, 1998; Yegorenkova *et al.*, 2001). ЭПС способны адсорбироваться на почвенных частицах и корнях за счет водородных связей, ионных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий с образованием защитной капсулы, которая удерживает воду и защищает растительные и бактериальные клетки от высыхания (Tisdall and Oades, 1982). ЭПС принимают участие в агрегировании почвенных частиц, что создает благоприятные условия для повышения водопроницаемости грунта и поддержания водного баланса в ризосфере, что облегчает поглощение питательных веществ растениями (Miller and Wood, 1996; Alami *et al.*, 2000).

ЭПС могут взаимодействовать с агглютинином зародышей пшеницы (АЗП), который, как предполагается, выступает в качестве посредника и сигнальной молекулы при формировании растительно-микробной ассоциации (Umali-Garcia *et al.*, 1980; Yagoda-Shagam *et al.*, 1988). Молекулы АЗП локализуются на корнях пшеницы и попадают в среду обитания, например, при проращивании семян (Иосипенко и др., 1996). Для бактерий *A. brasilense* Cd было показано связывание ЭПС с меченым

флуоресцеином АЗП, что объяснялось наличием в составе ЭПС значительных количеств D-GlcNAc (Haegi and Del Gallo, 1991). Взаимодействие АЗП с клетками бактерий *A. baldaniorum* Sp245 сопровождалось возрастанием азотфиксации, экскрецией ионов NH_4^+ и биосинтезом ауксинов (Антонюк и Игнатов, 2001; Антонюк и Евсеева, 2006), что указывает на всесторонний характер изменений в микробном метаболизме под действием молекул АЗП (Karpati *et al.*, 1999).

Сведения относительно химической структуры молекул ЭПС азоспирилл пока носят фрагментарный характер и не позволяют проследить зависимость строения данных гликанов от выполняемых ими функций, либо от условий существования.

ЭПС по своему составу достаточно близки к капсульным гликополимерам. В составе **капсулы** бактерий *Azospirillum* были обнаружены два высокомолекулярных полисахаридсодержащих комплекса – ЛПБК и ПСЛК (Skvortsov and Ignatov, 1998). Инкубация проростков пшеницы с капсульными комплексами азоспирилл вызывала деформацию корневых волосков. В связи с этим образцы ЛПБК и ПСЛК тринадцати штаммов вида *A. brasilense* проверяли на сродство к АЗП. Выраженную активность в отношении АЗП проявляли одиннадцать штаммов, причем ЛПБК и ПСЛК обладали одним порядком величин сродства к данному лектину (Skvortsov *et al.*, 1995). ЛПС, полученные из образцов ЛПБК азоспирилл, не взаимодействовали с АЗП (Егоренкова и др., 2001; Konnova and Ignatov, 2003), что, вероятно, может быть обусловлено изменениями конформации молекул после отделения белковой компоненты. В то же время ПС, выделенные из образцов ПСЛК бактерий *A. brasilense*, не утрачивали сродства к АЗП, причем специфичность их взаимодействия подтверждалась полным, либо частичным ингибированием после инкубации с D-GlcNAc (Konnova *et al.*, 1994; Skvortsov *et al.*, 1995). Помимо этого, капсульные комплексы способны вступать во взаимодействия с лектинами гомологичных штаммов азоспирилл (Никитина и др., 2001), а также с лектинами различных бактерий, например, ризобий и бацилл (Karpunina *et al.*, 2001; 2003). Подобные механизмы позволяют бактериям *Azospirillum* формировать клеточные агрегаты и флокулы, а также образовывать мультивидовые биопленки с другими ризобактериями, в том числе, на корнях растений.

Применительно к ЛПБК и ПСЛК различных видов азоспирилл были охарактеризованы биополимерный и моносахаридный составы, удельное вращение, молекулярная масса и т.д. (Skvortsov and Ignatov, 1998). В случае ЛПБК бактерий

A. lipoferum Sp59b была установлена первичная структура углеводной компоненты (Смолькина и др., 2010), которая отличалась от структуры О-полисахарида молекул ЛПС данного штамма (Fedonenko *et al.*, 2005). Подобный результат может свидетельствовать о наличии индивидуальных К-антигенов у бактерий *Azospirillum*, однако для подтверждения этой гипотезы необходимо провести исследование структуры ЛПБК других представителей данного рода.

В контактных взаимодействиях с различными объектами окружающей среды принимают активное участие и ЛПС внешней мембраны азоспирилл. По химической природе ЛПС являются амфифильными молекулами, состоящими из трех частей: гидрофобного домена – липида А, который заякоривает ЛПС в мембране, ковалентно присоединенного к нему корового олигосахарида и ОПС, экспонированного во внешнюю среду. Молекулы ЛПС, в которых присутствуют все три компонента, образуют S-форму, а молекулы ЛПС, в которых углеводная часть редуцирована до корового олигосахарида – R-формой. Все известные к настоящему времени штаммы бактерий *Azospirillum* характеризуются присутствием S-форм молекул ЛПС (Федоненко и др., 2015).

Изучение динамики адсорбции *A. baldaniorum* Sp245 и его омегон-Км мутанта (КМ252) с дефектами в структуре ЛПС продемонстрировало аналогичную адсорбционную способность бактерий родительского и мутантного штаммов к поверхности корней проростков пшеницы (сорт Саратовская 29). В то же время, адсорбция клеток мутанта КМ252 к корням на протяжении всего периода инкубирования была значительно ниже в сравнении с родительским штаммом. Было выявлено, что ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245 и его омегоновых мутантов вызывают деформацию корневых волосков у проростков пшеницы, причем наибольшей активностью обладал образец ЛПС родительского штамма (Федоненко и др., 2001). Изменение морфологии корневых волосков проростков пшеницы также наблюдалось в случае их обработки препаратом ЛПС бактерий *A. brasilense* SR55. В то же время, предобработка проростков исследуемым ЛПС стимулировала адсорбцию гомологичных бактерий на корнях пшеницы (Войко *et al.*, 2011). Tn5-мутант бактерий *A. brasilense* Cd, дефектный по биосинтезу dTDP-Rha, характеризовался модификациями в структуре ЛПС, что вероятно, влияло на способность данных бактерий прикрепляться к корням кукурузы и проявлять стимулирующий эффект (Jofré *et al.*, 2004).

К настоящему времени проведены исследования структуры ОПС, входящих в состав ЛПС, более 40 штаммов бактерий рода *Azospirillum*, полученных из ризосферы, либо с поверхности корней злаков, возделываемых на территории России, Бразилии, Индии, Эквадора, Китая и т.д. (Федоненко и др., 2015).

Серологический скрининг с применением полученных ранее поликлональных моноспецифических антител к образцам ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* Sp7 и *A. lipoferum* Sp59b позволил сформировать классификационную схему азоспирилл, которая включает три серогруппы (Бойко и др., 2010; Федоненко и др., 2011; Сигида и др., 2014; Федоненко и др., 2015).

Серогруппа I содержит штаммы *A. baldaniorum* Sp245, *A. brasilense* SR75, S27, Sp107, SR15, а также *A. lipoferum* RG20a. Серологическое родство серогруппы I обусловлено химической структурой ОПС, а именно наличием в их составе повторяющегося фрагмента: $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow$ (Бойко и др., 2010). Моносахарид Rha является одним из наиболее часто встречающихся сахаров в составе молекул ОПС азоспирилл и обнаружен во всех установленных на данный момент структурах повторяющихся звеньев.

Серогруппа II включает наибольшее количество штаммов азоспирилл и характеризуется выраженным разнообразием структур их О-полисахаридов. Основным критерием для отнесения бактерий *Azospirillum* в эту серогруппу выступают серологические перекресты в иммунохимических тестах с типовым штаммом *A. brasilense* Sp7. Химическая основа подобных перекрестов представителей данной серогруппы с типовым штаммом Sp7 выражается в сходстве повторяющихся звеньев в составе ОПС. Помимо этого, серологическое родство также может быть обусловлено наличием одинаковых структурных фрагментов в составе гликополимеров. К таким фрагментам относятся остатки моносахаридов $\alpha\text{-L-Rha}$, $\beta\text{-D-Gal}$ и терминальные остатки моносахарида L-Fuc (Сигида и др., 2014; Федоненко и др., 2015). В то же время, в данной серогруппе была выявлена иммунохимическая неоднородность ЛПС, которая, вероятно, обусловлена структурной гетерогенностью ОПС (наличием нескольких вариантов повторяющихся звеньев и их различным соотношением, а также присутствием О-метильных и О-ацетильных групп). В ЛПС бактерий *A. brasilense* SR55 был выявлен единственный среди азоспирилл «кислый» ОПС, состоящий из октасахаридных повторяющихся звеньев (Boyko *et al.*, 2011). Учитывая отсутствие

общих структурных элементов с ОПС *A. brasilense* Sp7, предполагается, что серологическое родство этих штаммов проявляется за счет общих эпитопов в составе коровых олигосахаридов ЛПС.

К серогруппе III относятся штаммы *A. lipoferum* SR5, SR16, SR38, SR61, SR65, SR66, SR85, SR98 и SpBr17, которые проявляют серологические перекресты с типовым штаммом *A. lipoferum* Sp59b (Федоненко и др., 2015). В ОПС данных штаммов присутствует одинаковый фрагмент, имеющий следующую структуру: $\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow$ (Федоненко и др., 2011). Внутри данной серогруппы также прослеживаются межштаммовые различия при взаимодействии с антисывороткой к ЛПС бактерий *A. lipoferum* Sp59b. Подобный результат может быть связан с отличиями в степени *O*-ацетилирования одного из остатков моносахарида L-Rha в основной цепи, а также с различиями в положении моносахарида D-глюкозы (D-Glc) в боковой цепи.

Следует заметить, что серологический статус для многих штаммов азоспирилл на сегодняшний день не уточнен. Превалирующие ОПС бактерий *A. brasilense* 54, SR8, Sp246, SpBr14 обладают идентичными повторяющимися звеньями, включающими в основную цепь по три остатка L-Rha и терминальный моносахарид D-Glc в составе боковой цепи. В минорном *O*-полисахариде данных бактерий имеется общий дисахарид следующей структуры в основной цепи: $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAc-}(1\rightarrow$. Повторяющиеся звенья данных ОПС различаются по терминальным остаткам в составе боковых цепей, которые представлены моносахаридами D-Gal4OMeNAc или D-Fuc3NAc (Sigida *et al.*, 2014; Федоненко и др., 2015). Сходный вариант структуры был определен для ОПС бактерий *A. brasilense* Jm125A2 (Sigida *et al.*, 2015) и *A. rugosum* DSM-19657 (Сигида и др., 2020). В преобладающем *O*-полисахариде данных штаммов, в отличие от ОПС штаммов 54, SR8, Sp246, SpBr14, остатки D-Rha имеют другой характер связи и второй из них замещен β -1,2-связанной D-Glc. Структура второго ОПС штаммов Jm125A2 и DSM-19657 уникальна для азоспирилл и включает дисахарид $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-}(1\rightarrow$ в основной цепи и терминальный остаток моносахарида D-Fuc3NAc в составе боковой цепи.

В повторяющемся звене *O*-полисахарида бактерий *A. halopraeferens* Au4 были обнаружены нестехиометрическое глюкозилирование и метилирование, комбинации которых маскировали структуру трисахаридного повторяющегося звена основной цепи

(Sigida *et al.*, 2016). В структуре ОПС типового штамма *A. doebereinae* GSF71 были обнаружены тетрасахаридные повторяющиеся звенья, состоящие из трех остатков моносахарида L-Rha, один из которых *O*-ацетилирован, и одного частично *O*-ацетилированного остатка D-GlcNAc (Sigida *et al.*, 2019). Вероятно, указанные штаммы в дальнейшем могут быть выделены в отдельную серогруппу.

Сведения о структуре коровых олигосахаридов ЛПС *Azospirillum* spp. практически отсутствуют, что связано с высокой степенью его замещения ОПС, а также трудностью гидролиза препаратов ЛПС в стандартных условиях (Choma *et al.*, 1984; 1987).

Структура липида А азоспирилл исследована крайне фрагментарно. Полная структура липида А была установлена для бактерий *A. lipoferum* SpBr17 (Choma and Komanińska, 2008) и *A. rugosum* DSM-19657 (Сигида и др., 2020). Было показано, что сахарный остов гидрофобного домена ЛПС обладает уникальным для представителей почвенной микрофлоры строением и состоит из невосстанавливающего трисахарида, в состав которого помимо глюкозаминбиозы входит остаток галактуроновой кислоты. Липид А бактерий *A. lipoferum* SpBr17 представлен пентаацелированными формами, а в случае *A. rugosum* DSM-19657 была выявлена смесь пента-, тетра- и триацелильных типов молекул. Первичной *N*-связанной жирной кислотой (ЖК) в данных липидах А выступала 3-гидроксигексадекановая кислота (3-ОН-C16:0), а первичной *O*-связанной – 3-гидрокситетрадекановая (3-ОН-C14:0). В качестве вторичных кислот были обнаружены гексадекановая (C16:0) и октадеценная (C18:1) ЖК, а также октадекановая (C18:0) в случае штамма SpBr17 и нонадекановая (C19:0) кислота для штамма DSM-19657.

Проведена характеристика состава ЖК липидов А ЛПС для более чем 30 штаммов бактерий рода *Azospirillum* (Игнатов и др., 2009; Сигида и др., 2014). Было выявлено относительное постоянство ЖК в образцах ЛПС, причем кислоты, обнаруженные в липидах А *A. lipoferum* SpBr17 и *A. rugosum* DSM-19657, являлись доминирующими. Исключением был препарат ЛПС бактерий *A. lipoferum* RG-20, в котором содержание 3-гидроксилированных ЖК составляло 92%. Образец ЛПС *A. lipoferum* Sp59b кардинально отличался по составу ЖК от ЛПС остальных штаммов: значительная доля ЖК приходилась на додекановую кислоту (C12:0) и в меньших количествах также были обнаружены 2-гидроксидодекановая (2-ОН-C12:0) и 3-гидроксидодекановая (3-ОН-C12:0) кислоты.

ЛПС грамотрицательных бактерий относятся к классу микробных «паттернов» или MAMP (microbe-associated molecular pattern), которые являются консервативными структурами, способными запускать механизмы врожденного иммунитета (Alexander and Rietschel, 2001). Биологическая активность ЛПС, включая токсичность, определяется степенью ацилирования, величиной заряда, природой и расположением ацильных цепей в липиде А (Schromm *et al.*, 2000). В связи с поиском эффективных природных иммуномодуляторов часто привлекают внимание исследователей ЛПС непатогенных бактерий, в том числе азоспирилл. Ранее было показано, что ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. lipoferum* Sp59b способны активировать факторы естественной резистентности организма животных (Фомина и др., 2009*a,b*; Суркина и др., 2013). Дальнейшее изучение структуры липидов А бактерий *Azospirillum* позволит оценить зависимость эндотоксических и иммуностимулирующих свойств молекул ЛПС от химического строения их липидного домена и откроет перспективы их практического применения в качестве антагонистов различных патогенов.

Разнообразие молекул, вовлеченных в адгезию азоспирилл к корням растений (флагеллин, лектины, экстраклеточные и мембранные гликополимеры и т.д.), свидетельствует о сложном механизме бактериального заселения, в котором каждый участник «молекулярного диалога» точно знает свою роль и безошибочно ее выполняет. На данный момент отсутствует полноценное представление о том, какой состав белковых и углеводных компонентов поверхности является более эффективным для реализации ассоциативных отношений. Однако дальнейшие работы в данном направлении помогут решить эту непростую задачу.

1.2.3 Особенности формирования биопленок бактериями *Azospirillum*

После этапа прикрепления и прочного заякоривания бактериальных клеток на корнях растений представители группы PGPR либо проникают внутрь, либо распространяются по корневой системе с образованием биопленок (Danhorn and Fuqua, 2007; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

Биопленки представляют собой непрерывный сформированный на границе раздела фаз мультислой клеток, погруженных во ВПМ. Образование биопленочных сообществ является важным адаптивным механизмом для бактерий в конкретной экологической нише, что позволяет им приобретать устойчивость к негативным факторам окружающей среды (Смирнова и др., 2010).

Мутанты эндофитного штамма *A. baldaniorum* Sp245 с дефектами в генах синтеза ЛПС внешней мембраны и ПС, связывающих калькофлюор, формировали биопленки на гидрофильной и гидрофобной поверхностях с меньшей толщиной, чем биопленки родительского штамма (Шелудько и др., 2008).

Позднее для мутантов бактерий *A. baldaniorum* Sp245 по генам *mmsB1* (SK039) и *fabG1* (Sp245.1610), которые кодируют ферменты липидного обмена, и *flhB1* мутанта (Sp245.1063), лишённого Fla и Laf, были охарактеризованы особенности биопленкообразования на абиотических поверхностях. Оказалось, что толщина и биомасса биопленок штамма Sp245.1063 на границе фаз «жидкость–твёрдая гидрофильная поверхность» значительно уступала таковым для штамма Sp245 (Шелудько и др., 2015; Филипьевичева и др., 2018). Данный факт указывает на важную роль Fla и Laf в стабилизации биопленок азоспирилл. Биомасса биопленок мутантов SK039 и Sp245.1610 на гидрофобном субстрате с использованием обогащенной и минеральной сред была меньше, чем для дикого типа. Аналогичные результаты были получены применительно к гидрофильному субстрату, однако в случае роста родительского штамма и мутанта Sp245.1610 в среде LB показатели биомассы биопленок были приблизительно одинаковыми (Шумилова и др., 2016). В дальнейших исследованиях была проведена комплементация мутанта SK039 геном *mmsB1* родительского штамма, которая сопровождалась изменениями в гидрофобности и текучести мембран комплементированных бактерий, а также накоплением биомассы в биопленках на различных поверхностях, соразмерной с биомассой штамма Sp245 (Shelud'ko *et al.*, 2019). Полученные данные свидетельствуют о сложном механизме регуляции формирования биопленок азоспирилл, в который вовлечены гены, ответственные за синтез ферментов как липидного метаболизма, так и сборки жгутиков.

Для оценки вклада биополимеров белковой природы и экстраклеточной ДНК в образовании биопленок бактериями *A. brasilense* проводили их обработку протеолитическими ферментами (Телешева и др., 2017) и ДНКазой (Филипьевичева и др.,

2018). Было установлено, что инкубация биопленок штамма Sp245 и его производных SK039, Sp245.1063 и Sp245.1610, образованных на границе «жидкость–стекло/полистирол» с проназой/трипсином, либо ДНКазой сопровождалась существенным снижением биомассы клеток. Такой результат объясняется вовлечением белков наружной мембраны и матрикса в процессы прикрепления клеток друг к другу и к различным поверхностям. В то же время, присутствие экстраклеточной ДНК в матриксе биопленок азоспирилл служит важным фактором стабилизации их трехмерной структуры и неотъемлемой частью данной многокомпонентной системы.

Также было показано, что спонтанные изменения в плазмидном составе бактерий типового штамма *A. brasilense* Sp7 оказывают негативное воздействие на образование биопленок на поверхности гидрофобных и гидрофильных абиотических сред (Петрова и др., 2010).

Мутанты бактерий *A. brasilense* Sp7 по гену *noeL*, который кодируют фермент ГДФ-маннозо-4,6-дегидратазу, участвующий в синтезе ЭПС и ЛПС, и по гену *glgP*, который ответственен за синтез гликогенфосфорилазы, образуют менее выраженные биопленки на гидрофильной, либо гидрофобной поверхностях, чем клетки родительского штамма (Lerner *et al.*, 2009*a,b*). Причем, мутанты по гену *noeL* становятся более подвержены стрессовым факторам, в отличие от мутантов по гену *glgP*, устойчивость которых к голоданию, высыханию и осмотическому стрессу, наоборот возрастает по сравнению с диким типом. Данный факт подтверждает важность формирования биопленок азоспириллами при изменении условий среды, однако включение компенсаторных механизмов при нарушении данного процесса указывает на наличие по крайней мере нескольких возможных путей стрессового ответа.

Также был опубликован ряд работ, в которых установлено, что мутанты, дефектные по генам, кодирующим периплазматическую нитратредуктазу (*narA*), которая участвует в синтезе эндогенного NO, дигуанилатциклазу А (*cdgA*), ответственную за синтез вторичного мессенджера циклического гуанозинмонофосфата, а также один из регуляторов транскрипции (*tyrR*) формировали биопленки, значительно уступающие по толщине биопленкам родительских штаммов (Arruebarrena Di Palma *et al.*, 2013; Ramírez-Mata *et al.*, 2016; Jijón-Moreno *et al.*, 2019). Все эти данные свидетельствуют о вовлечении в процесс образования биопленок различных клеточных

компонентов и систем, что определяет важность подобных сообществ для жизнедеятельности бактерий.

Нарушение синтеза белков CheA1 и CheY1 у мутантных штаммов *A. brasilense* Sp7, участвующих в Che1 пути хемотаксиса, сопровождалось изменениями в способности бактерий заселять абиотические и биотические поверхности при дефиците азота в питательной среде (Siuti *et al.*, 2011).

В работе Ramírez-Mata *et al.* (2018) было выполнено мечение бактерий *A. brasilense* Sp7, M40, а также Sp245 и его мутанта по гену *hkkB*, кодирующего гибридную гистидинкиназу, автофлюоресцентными белками, такими как Egfp и mCherry. С помощью флюоресцентной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была оценена способность данных штаммов к формированию биопленок на поверхности корней пшеницы. Подобный подход для анализа образования биопленок *in situ* бактериями *Azospirillum* поможет всестороннему пониманию процесса колонизации корневой системы растений-партнеров.

Поскольку на корнях растений азоспириллы сосуществуют с другими представителями группы PGPR были изучены механизмы их взаимного влияния друг на друга. Так, выяснилось, что бактерии *Pseudomonas fluorescens* F113 продуцируют вторичный метаболит 2,4-диацетилфлороглюцинол, который действует как сигнальная молекула на бактерии *A. baldaniorum* Sp245, усиливая их фитостимулирующее действие, а именно индуцирует подвижность клеток, образование биопленок, синтез поли- β -гидроксибутирата (ПГБ) и продукцию ауксинов (Combes-Meynet *et al.*, 2011).

Бактерии *Azospirillum* способны формировать мультивидовые биопленочные сообщества с рядом других микроорганизмов. Совместное культивирование ризобактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *Pseudomonas protegens* CHA0 приводило к образованию двухкомпонентных биопленок со специфическим распределением: азоспириллы локализовались в нижних слоях сообщества, а псевдомонады – на поверхности. Более того, толщина биопленок штамма Sp245, сформированных на гидрофобных субстратах совместно со штаммом CHA0, превышала такую для однокомпонентных биопленок в несколько раз (Pagnussat *et al.*, 2016).

В литературе приведены данные по совместному культивированию метиловых бактерий и азоспирилл. Оказалось, что бактерии *A. brasilense* CW903 существенно стимулируют биопленкообразование у *Methylobacterium oryzae* CBMB20 и

M. suomiense CBMB120. Причем совместная инокуляция штаммов CW903 и CBMB20 в составе альгинатных гранул в почву приводила к возрастанию устойчивости томатов к высушиванию (Joe *et al.*, 2014).

Также были исследованы механизмы «чувства кворума» или QS (quorum sensing) у штаммов *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 и *A. brasilense* Ab-V5 и Ab-V6, используемых в коммерческих ко-инокулянтах для выращивания сои в Бразилии. В геноме бактерий *B. japonicum* CPAC 15 присутствуют функциональные гены *luxI* и *luxR*, задействованные в продукции N-ацил-гомосеринлактонов и их рецепции, соответственно. Ранее было отмечено, что у штаммов Ab-V5 и Ab-V6 отсутствуют гены *luxI*, однако наличие множественных копий генов *luxR* способствуют связыванию экзогенных гомосеринлактонов и осуществлению реакций QS. Добавление гомосеринлактонов в среду выращивания азоспирилл регулировало процессы формирования биопленок, продукции ЭПС, а также плавания и роения только в случае штамма Ab-V5. Подобный эффект не проявлялся у штамма Ab-V6, вероятно, вследствие повышенного синтеза индолил-3-уксусной кислоты, которая может имитировать сигналы гомосеринлактонов (Fukami *et al.*, 2018c). Три класса ацетилированных гомосеринлактонов, которые выделяются брадиризовиями, воспринимались азоспириллами при совместном культивировании как сигналы для QS. Совместная инокуляция *B. japonicum* CPAC 15 и *A. brasilense* Ab-V5 способствовала значительному увеличению урожайности сои. Использование бактерий разных видов для инокуляции растений позволит повысить эффективность их заселения за счет реализации системы QS (Dos Santos Lima Fagotti *et al.*, 2019).

Интересно отметить, что азоспириллы часто встречаются в качестве важного компонента консорциумов, осуществляющих очистку сточных вод, в том числе, загрязненных нефтяными углеводородами (Fernández *et al.*, 2008; Al-Mailem *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019).

Полученные на данный момент сведения о биопленках бактерий рода *Azospirillum* оставляют без ответа многие вопросы о закономерностях их формирования и составе матрикса, как ключевого компонента любого биопленочного сообщества.

1.3 Ответные реакции бактерий рода *Azospirillum* на изменения условий культивирования

Формирование растительно-микробной ассоциации в естественной среде обитания происходит под влиянием изменяющихся факторов среды. Поэтому наряду с изучением закономерностей становления и существования системы «азоспирилла-растение» требуется исследование ответных реакций со стороны бактерий и растений на различные стрессовые воздействия. Такие работы расширят границы использования бактерий *Azospirillum* в составе микробных удобрений и помогут оптимизировать внесение инокулятов независимо от климатических условий и состояния почв.

В почве бактерии *Azospirillum* постоянно испытывают влияние изменяющихся условий среды, которые часто выходят за границы оптимальных для микроорганизмов значений. Адаптация бактериальных клеток к стрессовым воздействиям представляет собой каскад защитных реакций, в которые могут быть вовлечены различные компоненты поверхности, в том числе реализующие «молекулярный диалог» с растением экстраклеточные и мембранные гликаны. Среди широкого набора экологических факторов, воздействующих на почвенную микробиоту, следует отметить природу доступных источников углерода и азота и их соотношение, а также концентрацию солей и температуру.

1.3.1 Природа источника углерода и соотношение источников углерода и азота в питательной среде

Изучение влияния различных источников углерода и азота в среде на метаболизм представителей ризосферной микрофлоры, ввиду возможности их практического применения, приобретает особое значение. Обитание в условиях, далеких от оптимальных, а также взаимовыгодные отношения с растениями, требуют от данных бактерий широкой экологической пластичности в отношении потребляемых веществ для поддержания основных процессов жизнедеятельности. Однако, нередко утилизация

ризобактериями различных по природе углерод- и азотсодержащих веществ определяет их рост и скорость размножения, нитрогеназную активность, а также формирование ассоциаций с культурными растениями.

Бактерии рода *Azospirillum* успешно адаптируются к высокой конкуренции в ризосфере, в том числе за счет присутствия разнообразных путей углеводного и азотного обменов. В качестве **источников углерода** азоспириллы способны использовать соли органических кислот (яблочной, янтарной, молочной, пировиноградной, глюконовой, фумаровой и т.д.), моносахариды (арабинозу, фруктозу, глюкозу, маннозу, галактозу и т.д.), многоатомные спирты (инозитол, маннит, сорбит и т.д.), а также аминокислоты (глутаминовую и аспарагиновую кислоты, серин, гистидин и т.д.) (Westby *et al.*, 1983; Hartmann *et al.*, 1988), присутствующие в ризосфере растений. Активность нитрогеназного комплекса у бактерий *Azospirillum* напрямую зависит от источника углерода в питательной среде (Okon *et al.*, 1976; Naahtela *et al.*, 1983).

Азоспириллы проявляют способность утилизировать ксилан, который относится к группе гемицеллюлоз, а также ксилановый компонент соломы, на долю которого приходится около 25% от доли остальных составляющих (Halsall *et al.*, 1985). Для ряда штаммов *Azospirillum* также была выявлена экстраклеточная пектолитическая активность (Tien *et al.*, 1981; Plazinski *et al.*, 1985). Бактерии *A. brasilense* NBRC 102289 использовали в качестве источника углерода транс-4-гидроксипролин и транс(цис)-3-гидроксипролин, которые были обнаружены в составе белков клеточной стенки растений, а также некоторых пептидных антибиотиков (Watanabe *et al.*, 2017). Наличие ферментативной системы, помогающей разрушать как белковые, так и углеводные компоненты растительной клеточной стенки, вероятно, придает азоспириллам дополнительное преимущество при эндофитной колонизации корней макропартнеров.

Бактерии *A. brasilense* Sp81 поддерживают рост на средах, содержащих аминокислоты не только в качестве источника углерода, но и источника азота. Данный факт позволит применять для получения инокулятов азоспирилл бюджетные варианты сред, содержащие смесь определенных аминокислот (Bhattacharya, 2005).

Использование различных **соотношений углерода к азоту (C : N)** в питательных средах для бактерий *Azospirillum* часто сопровождается изменениями со стороны различных метаболических путей. Снижение содержания азота в средах культивирования бактерий *A. brasilense* Sp7 приводило к образованию цистоподобных

покоящихся клеток (Мулюкин и др., 2009), а также к увеличению лигнин-пероксидазной активности, которая способствует разрушению лигнина и ряда ароматических соединений (Никитина и др., 2012). Подобные эффекты отсутствовали при росте бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в средах аналогичного состава, что служило подтверждением значимости стратегии колонизации растений в реализации ответных реакций на изменение условий существования.

Выращивание бактерий *A. lipoferum* Sp59b, в средах, содержащих фруктозу и хлорид аммония/нитрат калия в качестве источника углерода и азота, соответственно, а также их соотношение (10 : 1) индуцировало изменения биополимерного состава и состава ЖК образцов ЛПБК и ЛПС (Суркина и др., 2017).

В работе Sadasivan and Neurga (1985) при выращивании азоспирилл в среде с 8 мМ фруктозы и 0.5 мМ нитрата калия (C : N = 96 : 1) впервые было выявлено явление **флокуляции**. При образовании флокул клетки теряют подвижность, накапливают гранулы ПГБ и увеличивают продукцию ЭПС и КПС, которые участвуют в образовании на поверхности клеток плотного чехла. Клетки во флокулах объединены фибриллярным материалом, предположительно состоящим из целлюлозы, которая поддерживает стабильность всей надклеточной структуры (Del Gallo *et al.*, 1989). Подобные формы помогали клеткам выдерживать высушивание и хранение в течение шести месяцев (Sadasivan and Neurga, 1985). Помимо этого, флокулы обладают устойчивостью к различного рода воздействиям (ультразвук, изменение pH среды, повышенная температура) (Burdman *et al.*, 1998).

В формировании агрегатов и флокул у бактерий *Azospirillum* в качестве факторов адгезии задействованы Fla и белковые компоненты поверхности (Burdman *et al.*, 2000a). К числу последних относят лектины (Никитина и др., 2001; Mora *et al.*, 2008), а также основной белок наружной мембраны, обозначенный как MOMP (major outer-membrane protein) (Burdman *et al.*, 2001). MOMP, помимо важной роли в межклеточных взаимодействиях, также принимает участие в прикреплении азоспирилл к корням растений при их колонизации (Burdman *et al.*, 2001).

Экстраклеточные и мембранные гликополимеры бактерий *Azospirillum* также вовлечены в агрегацию и флокуляцию. Клетки мутанта Sp7-S, полученного в результате спонтанного мутагенеза бактерий *A. brasilense* Sp7, проявляли слабую окраску под воздействием конго красного, и были не способны к флокуляции в среде с фруктозой и

нитратом калия. На поверхности клеток данного мутанта отсутствовал плотный полисахаридный чехол (Katuritiya *et al.*, 1995). Сходные результаты были получены для Tn5-производного штамма Sp7 со вставкой в гене *flcA* (Pereg-Gerk *et al.*, 1998).

Регуляторный белок FlcA, который кодируется геном *flcA*, контролирует не только процесс флокуляции культур, в том числе посредством участия в продукции экстраклеточных гликополимеров, но и стрессоустойчивость и углеводный метаболизм, а также влияет на определенные стадии колонизации растений (Valverde *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2014). Мутация *A. brasilense* Sp7 в гене *orf280*, продуктом которого является белок ORF280, имеющий сходство с семейством универсальных стрессовых белков, также приводит к нарушению флокуляции и снижению стрессоустойчивости (Galindo Blaha and Schrank, 2003). Данные результаты указывают на то, что образование агрегатов и флокул неразрывно связано с защитными реакциями азоспирилл на различные негативные воздействия окружающей среды.

Белки, составляющие Che1 путь регуляции хемотаксиса, также влияют на флокулообразование. Было установлено, что белки CheA1, CheY1, CheB1 и CheR1 определяют не только жгутиковую подвижность азоспирилл, но и адгезивные свойства поверхности клеток и первые этапы формирования агрегатов (Bible *et al.*, 2015). Мутанты типового штамма Sp7 по генам *cheB1* и *cheR1* проявляли меньшую флокулирующую активность в сравнении с бактериями дикого типа (Bible *et al.*, 2008). Мутации в генах *cheA1* и *cheY1* приводили к изменениям в структуре межклеточного матрикса флокул и электрофоретических профилей ЛПС, а также индуцировали взаимодействие клеток с лектинами чечевицы и лимской фасоли, что было не характерно для представителей родительского штамма (Edwards *et al.*, 2011).

У бактерий рода *Azospirillum* переход планктонной формы к флокулирующей сопровождался изменениями в составе и структуре экстраклеточных гликанов. Выращивание бактерий *A. brasilense* Sp7, Cd, а также мутанта, обладающего повышенной флокулирующей активностью, в средах с фруктозой и хлоридом аммония (C : N = 55.5 : 1), приводило к продукции ЭПС и КПС, обогащенных моносахаридом арабинозой. Данный моносахарид не обнаруживался в ЭПС и КПС при росте штаммов Sp7 и Cd в средах с пониженным соотношением C : N (18.3 : 1), а также у мутантного штамма по гену *flcA* (Burdman *et al.*, 2000b). В дальнейшем было показано, что агрегация и флокуляция азоспирилл коррелировала с синтезом ЭПС, содержащих арабинозу.

Мутанты по генам *exoB* (УДФ-глюкоза-4'-эпимераза), *exoC* (фосфоманномутаза), *phbC* (ПГБ-синтаза) выделяли ЭПС с арабинозой в составе и обладали выраженной флокуляцией, в отличие от мутанта по гену *rmlD* (DTDP-4-рамнозоредуктаза), который продуцировал ЭПС с Glc в составе и проявлял слабую агрегацию клеток (Bahat-Samet *et al.*, 2004). Подобные изменения структуры ЭПС и КПС, вероятно, отражались на способности азоспирилл взаимодействовать с растениями.

Флокулирующие культуры *Azospirillum* обладают большей адгезией к поверхности корней растений, чем планктонные формы, а также показывают высокую выживаемость в ризосфере и ризоплане злаков в условиях засухи (Burdman *et al.*, 2000a; Joe *et al.*, 2010). Длительное голодание и высев азоспирилл с поверхности корней кукурузы после предварительной инокуляции привели к ряду фенотипических вариаций бактерий, среди которых увеличение продукции ЭПС и повышение флокуляции (Lerner *et al.*, 2010). Такие результаты свидетельствуют, что эффективность формирования растительно-микробных ассоциаций зависит от образования агрегатов и флокул, которые повышают выживаемость бактерий в почве и стимулируют установление контакта с растениями.

Штаммы азоспирилл, у которых флокуляция была выражена крайне слабо, либо полностью отсутствовала, в отличие от флокулирующих форм заселяли корни растений по альтернативному пути. В экспериментах *in situ* спонтанный мутант Sp7-S и мутант по гену *flcA* колонизировали места ветвления боковых корней и различные поврежденные участки с дальнейшим проникновением. Поскольку защитные реакции, связанные с агрегацией клеток, у мутантных бактерий нарушены, они вынуждены приспосабливаться к «более безопасному» эндофитному образу жизни. Активность нитрогеназного комплекса данных штаммов превышала таковую у дикого типа азоспирилл, что позволяло в короткие сроки повысить эффективность взаимодействия с растениями (Katupitiya *et al.*, 1995; Pereg-Gerk *et al.*, 2000). Наличие эндофитного и эпифитного вариантов колонизации дикорастущих и злаковых культур помогает бактериям рода *Azospirillum* формировать продуктивные ассоциации, независимо от различных условий среды.

Ограничения в использовании азоспирилл в качестве компонента микробных удобрений, в том числе в виде флокулирующих форм, связаны с недостаточной изученностью ответных реакций бактерий со стороны углеводов и белковых

компонентов поверхности. Дальнейшие исследования воздействия различных по природе источников углерода и азота, а также их содержания и соотношения в почве на гликополимеры ризобактерий *Azospirillum* позволят открыть новые перспективы их практического применения.

1.3.2 Осмотический стресс

Поскольку современные методы ведения сельского хозяйства сопровождаются чрезмерным внесением в почву химических удобрений ризобактерии должны эффективно справляться с повышенным давлением почвенного раствора. Одной из адаптационных стратегий бактерий к такому воздействию является накопление осмолитов – веществ, поддерживающих объем клетки на постоянном уровне и стабилизирующих ферменты и другие клеточные компоненты. При солевом стрессе накопление осмопротекторов происходит либо в результате синтеза *de novo*, либо при поглощении посредством специфических переносчиков.

У бактерий *Azospirillum* в качестве одного из осмолитов может выступать глицинбетаин. При добавлении 1 мМ глицинбетаина в питательную среду, содержащую 300 мМ NaCl, рост типового штамма *A. brasilense* Sp7 восстанавливался и достигал уровня стандартных значений (Riou and Le Rudulier, 1990). В работе Tripathi *et al.* (2002) было установлено, что увеличение содержания соли (200-400 мМ) подавляет активность нитрогеназного комплекса бактерий *A. brasilense* Sp7, а также ингибирует его биосинтез. Внесение 1 мМ глицинбетаина способствовало повышению активностей ферментов синтеза нитрогеназы и стимулировало процессы азотфиксации (Tripathi *et al.*, 2002). В условиях солевого стресса у азоспирилл увеличивалась скорость транспорта глицинбетаина, причем внутриклеточное содержание данного осмопротектора коррелировало с концентрацией NaCl в среде (Riou and Le Rudulier, 1990). У бактерий *A. brasilense* Sp7 был обнаружен периплазматический белок с молекулярной массой 32 кДа, участвующий в транспорте глицинбетаина. Активность данного транспортного белка проявляется лишь при повышенных концентрациях NaCl (Riou *et al.*, 1991).

Помимо глицинбетаина, азоспириллы используют при солевом стрессе глутамат и пролин как осмотически активные вещества. Бактерии *A. brasilense* SBR, SHS6 и SLM5 способны расти при концентрации 500 мМ NaCl в среде и накапливать в клетках пролин и глутамат, которые синтезируют самостоятельно, либо поглощают из среды. Повышение концентрации соли до 900 мМ приводило к ингибированию роста штаммов SBR и SLM5. Бактерии *A. brasilense* SHS6 были более устойчивыми к солевому стрессу и при увеличении содержания соли аккумулировали пролин в больших количествах, чем глутамат (Madkour *et al.*, 1990). В случае штамма *A. brasilense* Cd спустя 24 ч культивирования в среде с 300 мМ NaCl в клетках возрастало содержание глутамата, а спустя 48 ч – концентрация K⁺ и глюкоз, которые также принимали участие в компенсаторных механизмах, направленных на поддержание устойчивости бактерий к солевому стрессу (Rivarola *et al.*, 1998).

Один из механизмов адаптации азоспирилл к повышенному содержанию солей заключается в модификации состава и структуры различных компонентов поверхности. Так, при выращивании бактерий *A. brasilense* Cd в среде с 300 мМ NaCl наблюдались изменения в моносахаридном составе образцов ЭПС, а также в электрофоретических профилях молекул ЛПС (Fischer *et al.*, 2003). В дальнейшем, при изучении устойчивости изолятов азоспирилл, выделенных из ризосферы злаков и трав в Индии, и штаммов Sp7 и Cd к солевому стрессу, оказалось, что при росте в среде, содержащей 300 мМ NaCl, увеличивается продукция ЭПС и возрастает клеточная агрегация. Данный эффект обнаруживался у всех исследованных изолятов и штаммов, но степень его проявления варьировала (Chowdhury *et al.*, 2007). Однако, в случае Tn5-мутанта штамма *A. brasilense* Cd со вставкой в гене *ddlB*, кодирующем D-аланин-D-аланин лигазу, которая участвует в биосинтезе пептидогликана, была обнаружена повышенная чувствительность клеток к воздействию солевого стресса, несмотря на гиперпродукцию ЭПС (Jofré *et al.*, 2009). Также было установлено, что при солевом стрессе у азоспирилл возрастает экспрессия генов, вовлеченных в биосинтез ЭПС, КПС и ЛПС, пептидогликана, липидного бислоя и других компонентов клеточной стенки (Nagarajan *et al.*, 2007). Мутанты бактерий *A. brasilense* Sp7 с нарушением в синтезе ЭПС и ЛПС проявляли большую чувствительность к солевому стрессу (300-500 мМ NaCl), чем родительский штамм (Lerner *et al.*, 2009b,c).

Как было показано в ряде работ, адсорбция бактерий *A. brasilense* Cd на корнях пшеницы и кукурузы, и их последующая колонизация в условиях солевого стресса осуществляются по альтернативному пути (Jofré *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 2000). Такой механизм, вероятно, был связан с нарушением синтеза белка наружной мембраны с массой 100 кДа и с модификацией гликанов поверхности (Jofré *et al.*, 1998). В связи с этим, стратегия изменения продукции и состава экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *Azospirillum* в ходе приспособления к данному стрессору, вероятно, реализуется для более эффективного заселения растений. Поскольку при повышенном содержании солей в почве растения вырабатывают осмолиты, их поглощение и накопление также помогают азоспириллам, находящимся в составе растительно-микробной ассоциации, адаптироваться к стрессовым условиям.

Таким образом, оба механизма приспособления *Azospirillum* проявляются при становлении и функционировании растительно-микробного консорциума в природной среде обитания.

В Аргентине применяются микробные удобрения, содержащие бактерии *A. brasilense* Az39, устойчивые к осмотическому стрессу и повышающие устойчивость растений к условиям засухи. В работе García *et al.* (2017) в результате скрининга штаммов *A. brasilense* в отношении стрессоустойчивости в условиях аридного климата был отобран штамм *A. brasilense* Az19, способный расти в среде с 200 мМ NaCl, и при внесении в качестве инокуляционного материала в почву стимулирующий рост кукурузы в условиях дефицита воды (García *et al.*, 2017).

Несмотря на наличие данных о защитных механизмах азоспирилл в ответ на осмотический стресс вопросы зависимости состава и структуры экстраклеточных и мембранных гликанов от повышенных концентраций солей в среде культивирования остаются пока не освещенными. Изучение подобной адаптационной стратегии является важным для расширения представлений о возможных механизмах стрессоустойчивости бактерий *Azospirillum* и их влияния на формирование растительно-микробной ассоциации.

1.3.3 Температурный стресс

Температурные воздействия выступают одним из внешних факторов, которые определяют жизнедеятельность бактерий на всех стадиях их развития и существования. Бактерии рода *Azospirillum* относятся к мезофилам и проявляют рост в интервале температур от 4 до 45°C (Stephan *et al.*, 1981). Кратковременное нагревание штамма *A. baldaniorum* Sp245 при 46 и 48°C приводило к гибели более 50% клеточной популяции, однако капсулированные клетки проявляли большую устойчивость в сравнении с бескапсульными. Добавление препаратов ЛПБК и ПСЛК капсулы штамма Sp245 способствовало увеличению количества жизнеспособных клеток после термического воздействия. Аналогичные результаты были получены при воздействии низких температур (-20 и -70°C) на азоспириллы (Коннова и др., 2001). На данный момент имеется немного сведений о термостабильности азоспирилл и о механизмах, которые обеспечивают выживание данных бактерий в ризосфере растений при изменении температурного режима. Полученные результаты позволяют предположить, что увеличение устойчивости бактерий *Azospirillum* к изменению температур в присутствии капсульных гликополимеров может объясняться присутствием ненасыщенных ЖК в составе ЛПБК и ПСЛК. Данные ЖК, вероятно, способствуют увеличению эластичности и проницаемости мембран азоспирилл, а также изменению температуры фазового перехода липидного бислоя.

Проведенный анализ литературных данных показал, насколько значимую роль в формировании растительно-микробных ассоциаций выполняют экстраклеточные и мембранные гликополимеры бактерий *Azospirillum*. Однако, имеется пробел в исследовании симбиотического фенотипа азоспирилл, который бы не только обеспечивал эффективное взаимодействие с растениями-партнерами, но и повышал бы продуктивность подобных ассоциаций, независимо от условий среды. Несмотря на имеющиеся на сегодняшний день сведения о механизмах стрессового ответа азоспирилл, остаются без внимания вопросы об адаптивных свойствах ЭПС, КПС и ЛПС. Для бактерий группы PGPR изучены особенности образования биопленок на

корнях растений, но не рассмотрены возможные модификации углеводных компонентов поверхности и матрикса при «переключении» от планктонного образа жизни к биопленочному. Расширение представлений о вариативности состава и структуры ЭПС, КПС, ЛПС в случае планктонных культур, а также ЛПС и ВПМ в случае биопленок, позволит сделать первый шаг на пути оптимизации применения биоудобрений в сельском хозяйстве.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Бактериальные культуры, условия их выращивания и хранения

Объектами исследования являлись бактерии *A. baldaniorum* и *A. halopraeferens*, которые были предоставлены коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Сведения о выбранных штаммах приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Бактерии рода *Azospirillum*, исследуемые в настоящей работе

Вид и штамм	Источник выделения	Ссылка
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 ИБРРМ 219 (ранее <i>A. brasilense</i> Sp245)	поверхностно стерилизованные корни пшеницы (<i>Triticum</i> sp.), Бразилия	Baldani <i>et al.</i> , 1983; Dos Santos Ferreira <i>et al.</i> , 2020
<i>A. halopraeferens</i> Au4 ИБРРМ 221	ризоплана лептохлой темной (<i>Leptochloa fusca</i> L. Kunth), Пакистан	Reinhold <i>et al.</i> , 1987

Для выращивания бактериальных культур использовали следующие питательные среды:

1. Стандартная синтетическая среда, предложенная Von Bülow и Döbereiner (1975) для культивирования азоспирилл и модифицированная Конновой с соавт. (1994) до следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 2.0, K_2HPO_4 – 3.0; NaCl – 0.1, $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.002, CaCl_2 – 0.02, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; яблочная кислота – 5.0; NH_4Cl – 2.5; агар-агар – 20.0 (в случае приготовления плотной среды). С помощью 10 М NaOH реакцию полученного раствора доводили до pH 6.6-6.8. К среде непосредственно перед стерилизацией добавляли растворы витаминов (1 мл/л) и сульфата железа в хелатированной форме (10 мл/л). Состав раствора витаминов (г/л): тиамин – 0.4, биотин – 0.5, пиридоксаль – 0.2. Состав раствора хелата железа (г/л): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2.0; нитрилтриуксусная кислота – 5.6.

2. Синтетическая малатная среда для культивирования галотолерантных бактерий *A. halopraeferens* Au4 была аналогична по составу среде, предложенной в

работе (Konnova *et al.*, 1994), за исключением содержания NaCl, которое было увеличено до 0.5%.

3. Синтетическая среда с фруктозой в качестве источника углерода. Для поддержания в средах соотношения углерода и азота (C : N) на уровне 3.2:1 фруктозу вносили в количестве 4.5 г/л. Содержание остальных компонентов среды не отличалось от указанных в пункте 1.

4. Синтетическая малатная среда (см. пункт 1) с увеличенным содержанием NaCl, 14.5 г/л.

Стерилизацию сред осуществляли путем автоклавирования при давлении 1 атм в течение 30 мин с температурой 121°C. Для предотвращения выпадения осадка растворы солей кальция и магния стерилизовали (1 атм, 30 мин, 121°C) отдельно и смешивали с остальными компонентами в асептических условиях. Раствор фруктозы для питательной среды, указанной в пункте 3, дробно пастеризовали при температуре 60°C в течение часа ежедневно на протяжении пяти суток и добавляли непосредственно перед посевом бактериальных культур.

Бактерии *A. brasilense* и *A. halopraeferens* культивировали в колбах Эрленмейера в термостатируемых условиях при температуре 30 и 41°C, соответственно. В случае экспериментов с температурным стрессом выращивание бактерий *A. baldaniorum* Sp245 выполняли в диапазоне температур 40-45°C.

Рост азоспирилл осуществляли при встряхивании на шейкере с частотой 120 об/мин. Для получения биопленок бактерии рода *Azospirillum* оставляли в стационарных условиях.

Продолжительность выращивания бактерий при перемешивании составляла 24 ч, что совпадало с окончанием экспоненциальной фазы. В ряде экспериментов длительность выращивания была увеличена до 120 ч, что соответствовало поздней стационарной фазе роста.

Контроль чистоты посевного материала выполняли посредством микроскопии на приборе BIOLAR PI (увеличение $\times 480$) с применением метода «раздавленной капли» (Егоров, 1995).

Азоспириллы поддерживали на агаризованной (2% агар-агар) питательной среде при температуре 4°C. Бактериальные культуры закладывали на длительное хранение в

синтетической среде с малатом натрия при добавлении глицерина (15% по объему) в качестве криопротектора при -70°C .

2.2 Приборы и материалы

Взвешивание реактивов осуществляли на аналитических весах AXIS AGN200 (AXIS, Польша) и Scout Pro (OHAUS Corporation, США), механических весах ВЛКТ-160 (ГОСМЕТР, СССР) и торсионных весах WAGA TORSYJNA-WT (TECHNIPROT, Польша).

Полнота растворения препаратов достигалась при помощи магнитной мешалки с подогревом MSC basic C (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия), вортекса Reax top (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия) и ультразвуковой ванны Elmasonic S (Elma Schmidbauer GmbH, Германия).

Величину водородного показателя растворов определяли на цифровом рН-метре Delta 320 (METTLER-TOLEDO GmbH, Швейцария).

Световую микроскопию бактериальных культур осуществляли с использованием поляризационно-интерференционного микроскопа BIOLAR PI (PZW, Польша) с объективами $\times 10$, 20, 40 и окуляром $\times 12$.

Осаждение клеток бактерий и отделение культуральной жидкости, разделение многокомпонентных смесей и удаление осадков осуществляли с применением следующих центрифуг: K-80 (MLW, ГДР), MiniSpin (Eppendorf AG, Германия) и Allegra X-30R (Beckman Coulter, Inc., США).

Концентрирование растворов проводили на испарителях LABOROTA 4000 efficient (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия) и RV 10 digital (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия) с вакуумным насосом LABOPORT (KNF Neuberger GmbH, Германия). Упаривание образцов выполняли при температуре $40-50^{\circ}\text{C}$ при пониженном давлении.

Диализ препаратов для очистки от низкомолекулярных примесей проводили в диализных трубках Cellu-Sep (Sigma-Aldrich, Inc., США) с пределом 12-14 кДа.

Сублимационную сушку препаратов проводили на лиофилизаторе BenchTop 2K (VirTis, США) при температуре -57°C и давлении 2-5 мм.рт.ст.

Электрофоретическое разделение образцов осуществляли в камере для вертикального электрофореза с заливочным устройством VE-10 на два геля (Helicon, Россия) с источником питания Эльф-8 (НПФ ДНК-технология, Россия).

С применением метода матрично-ассоциированной лазерной дисорбционной/ионизационной времяпролетной (МАЛДИ) масс-спектрометрии на приборе ultrafleXtreme с подложкой MTP AnchorChip 384 BC (Bruker Daltonics Inc., США) выполняли идентификацию белковых молекул. Анализ полученных пиков проводили на программном обеспечении flexAnalysis 3.2 (Bruker Daltonics Inc., США). Во время пробоподготовки образцы высушивали на вакуумном концентраторе RapidVar (Labconco Corporation, США).

Гидролиз образцов выполняли в аналоговом нагревателе Modular Block Dri-Baths (Thermo Fisher Scientific, Inc., США).

Для гель-фильтрации использовали комплект колонок с носителями Sephadex G-50, Sepharose CL-4B и CL-6B (GE Healthcare, США). Скорости элюции оптимизировали с помощью многоканального перистальтического насоса Minipuls 3 (Gilson, Inc., США). В случае препаративных разделений образцов собирали фракции с помощью коллектора FCC-60 (Чехословакия). Измерения оптической плотности проб при проведении спектрофотометрических и колориметрических исследований осуществляли на спектрофотометре Specord 40 (Analytic Jena AG, Германия).

Моносахариды и метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) идентифицировали на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 с детекторами ПИД и ПФД (Shimadzu Corporation, Япония) и с капиллярными колонками DB-5 (Hewlett-Packard Development Company, L.P., США) и EQUITY-1 (Supelco, США).

Запись ЯМР спектров осуществляли на спектрометре DRX-500 (Bruker Corporation, Германия) со стандартным математическим обеспечением от фирмы Bruker. С помощью программы XWINNMR 2.1. проводили сбор и обработку ЯМР спектров.

Результаты проведенных экспериментальных работ обрабатывали статистическими методами (Лакин, 1990). Выполняли минимум три биологических эксперимента, каждый из которых проводился в трех аналитических повторностях. Все

данные представлены в виде средних значений с доверительными интервалами, указанными для уровня статистической значимости 95%.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Микроскопические методы исследования

2.3.1.1 Фазово-контрастная микроскопия

Фазово-контрастную микроскопию биопленок и измерение их толщины проводили на лазерном диссекторе Leica LMD 7000 (Leica Microsystems, Германия). Процедуру подготовки препаратов для микроскопии и анализ результатов выполняли в соответствии с работой (Шелудько и др., 2015).

2.3.1.2 Конфокальная микроскопия

Подготовка биопленок к конфокальной микроскопии включала несколько основных этапов. На первом этапе проводили обработку образцов 1% водным раствором обезжиренного сухого молока на протяжении 2 ч для блокировки сайтов неспецифического взаимодействия с антителами. На следующем этапе инкубировали биопленки с родоспецифическими антителами к основным белкам поверхности бактериальных клеток и с поликлональными антителами к ЛПС гомологичного штамма в течение 12 ч. Несвязавшиеся антитела удаляли трехкратным отмыванием с помощью фосфатного буфера. Третий этап заключался в мечении первичных антител с помощью анти-кроличьих антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем ТРИТЦ (Thermo Fisher Scientific, США) (1 ч в затемненном месте). Избыток вторичных антител трижды смывали с поверхности биопленок фосфатным буфером. Полученные

препараты биофлюоресцентных меток, просматривали на конфокальном микроскопе TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия).

2.3.2 Определение относительной гидрофобности поверхности бактериальных клеток

Относительную гидрофобность поверхности клеток азоспирилл устанавливали с применением теста солевой агрегации (Lindahl *et al.*, 1981). В первую очередь готовили разведения сульфата аммония в фосфатном буфере от насыщенного раствора до 9.5% с шагом в 1.5%. В лунки полистиролового планшета вносили по 25 мкл раствора сульфата аммония в соответствующих концентрациях. Далее в каждую лунку добавляли по 25 мкл бактериальной суспензии ($A_{600} = 1.2$), полученной после однократного отмывания культуры в фосфатном буфере. Планшет оставляли на 10-12 ч при 4°C. Степень образования агрегатов бактериями оценивали визуально и отмечали концентрацию соли в лунке, в которой агрегация была выражена слабее.

2.3.3 Количественная оценка агрегации бактериальных культур

Агрегацию клеток бактерий измеряли согласно методике, предложенной в работе (Madi and Henis, 1989), с некоторыми модификациями. Аликвоту бактериальной культуры (5 мл) переносили в конические пробирки и оставляли на 20 мин для осаждения агрегатов на дно. После отстаивания измеряли поглощение «супернатанта» на спектрофотометре при $\lambda = 540$ нм (A_s). Клеточные агрегаты разбивали обработкой ультразвуком на протяжении 5-10 мин с последующим встряхиванием на шейкере в течение 5 мин, и измеряли поглощение при длине при $\lambda = 540$ нм (A_t). Агрегацию клеток рассчитывали по формуле (1):

$$\% \text{ агрегации} = [(A_t - A_s) \times 100] / A_t \quad (1).$$

2.3.4 Выделение и очистка экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий

2.3.4.1 Получение экзополисахаридов и капсульных полисахаридов

Получение ЭПС из культуральной жидкости бактерий осуществляли в соответствии с протоколом, указанным в работе (Del Gallo and Haegi, 1990). На первом этапе биомассу клеток осаждали в течение 30 мин при частоте оборотов $3000 \times g$. Супернатант, полученный после центрифугирования, упаривали примерно в 20 раз и диализовали против дистиллированной воды в течение трех суток. На следующем этапе проводили концентрирование данной смеси в 15 раз. Далее добавляли охлажденный этиловый спирт (три объема). Смесь экспонировали при температуре -20°C в течение суток. Осадок полисахаридов сепарировали от примесей центрифугированием в течение 20 мин при $16000 \times g$. Осадок редиспергировали в воде и диализовали против дистиллированной воды в течение суток. Полученную фракцию ЭПС очищали гель-фильтрацией на колонке с носителем Sepharose CL-6B. На последнем этапе проводили лиофилизацию ЭПС.

Для получения капсулы с поверхности клеток биомассу перерастворяли в 0.15 М NaCl и в течение суток перемешивали на магнитной мешалке. После этого проводили центрифугирование в течение 20 мин при частоте оборотов $16000 \times g$. Капсульный материал отмывали с клеток в течение шести суток с заменой 0.15 М NaCl каждые 24 ч. Полученную после двух суток отмывания капсулу упаривали и подвергали диализу против дистиллята (48 ч). Обессоленную фракцию КПС очищали гель-фильтрацией на колонке с носителем Sepharose CL-6B. Очищенный КПС, который выходил с нулевым объемом колонки, собирали и лиофилизировали.

Для структурных исследований гликополимеров капсулы обессоленную фракцию КПС разделяли гель-фильтрацией на колонке с Sepharose CL-4B. Высокомолекулярная фракция, которая характеризовалась тем, что максимумы поглощения по углеводным и белковым молекулам соотносились со сходными элюиционными объемами, была обозначена как ЛПБК, в то же время, фракция с меньшей долей белков и большим

количеством углеводов – как ПСЛК. Растворы капсульных комплексов упаривали и переводили в лиофильно высушенную форму.

2.3.4.2 Выделение экстраклеточного полимерного матрикса биопленок

Биопленки отделяли от планктонной культуры с помощью нейлонового крупноячеистого фильтра, затем суспендировали в небольшом объеме фосфатного буфера и обрабатывали ультразвуком (37 кГц, 40°C) двукратно по 30 мин. Клетки из суспензии осаждали центрифугированием при $3000 \times g$ (30 мин), а надосадок, который содержал матрикс, очищали через диализные мембраны против дистиллята (48 ч), упаривали и высушивали с использованием лиофильной сушки.

2.3.4.3 Экстракция липополисахаридов из внешней мембраны бактерий

Бескапсульные клетки, а также биомассу клеток биопленок, полученную после отделения ВПМ, обрабатывали ацетоном трижды, подсушивали на воздухе и гомогенизировали. Экстракцию ЛПС проводили по модифицированной методике Вестфалля горячим 45% водным раствором фенола без разделения водного и фенольного слоев (Кульшин и др., 1987). Фенол из экстракта удаляли диализом против проточной воды в течение пяти суток. Затем экстракт ЛПС концентрировали, осаждали примеси нуклеиновых кислот и белков внесением 40% трихлоруксусной кислоты до конечного значения pH 2.7 и центрифугировали ($16000 \times g$, 20 мин) для удаления осадка. Полученный надосадок диализовали против дистиллированной воды (48 ч) и подвергали гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose CL-6B. Высокомолекулярную фракцию ЛПС, которая выходила с холостым объемом, собирали и упаривали. После хроматографической очистки ЛПС высушивали лиофильно.

Для выделения ЛПС из внешней мембраны бактерий также использовали методику, предложенную в работе (Leive *et al.*, 1968). Бактериальные клетки осаждали в

течение 10 мин при $13000 \times g$, дважды отмывали в фосфатном буфере и обрабатывали ЭДТА-содержащим экстрагирующим буфером (15 мин). Полученные экстракты освобождали от белковых примесей с помощью протеолиза, добавляя к образцам раствор фермента протеиназы К (Sigma-Aldrich, Inc., США).

2.3.4.4 Деградация гликополимеров и получение О-специфических полисахаридов

Данная методика применялась для выделения О-полисахаридов из ЛПС и ПС из ЛПБК. На первом этапе экстракции образцы обрабатывали 2% уксусной кислотой. Затем гидролизовали при 100°C в течение 4-5 ч (Müller-Seitz *et al.*, 1968). Липидные фракции из гидролизатов удаляли центрифугированием в течение 20 мин при частоте оборотов $13000 \times g$. После центрифугирования отбирали супернатанты, которые содержали полисахаридные фракции. На следующем этапе данные фракции разделяли гель-фильтрацией на колонке с носителем Sephadex G-50. Собирали высокомолекулярные фракции, соответствующие ОПС/ПС, которые в дальнейшем концентрировали и лиофильно высушивали.

2.3.5 Хроматографические методы

2.3.5.1 Гель-фильтрация

Для гель-фильтрации в аналитическом и препаративном вариантах применяли колонки с носителями Sepharose CL-4В и CL-6В, и Sephadex G-50. Условия, при которых осуществляли разделение препаратов, указаны в Таблице 3. В случае аналитической гель-фильтрации определяли содержание углеводов во фракциях по абсорбции продуктов реакции элюата с фенолом и серной кислотой, измеренной при $\lambda = 490$ нм (DuVois *et al.*, 1956), а также белков по абсорбции образцов при $\lambda = 280$ нм. При графическом представлении результатов хроматографии в виде профилей элюции

на оси ординат откладывали величины $A_{280/490}$, а на оси абсцисс – объем собранных фракций.

Таблица 3 – Хроматографические колонки и параметры элюции

Носитель	Размер колонки, см × см	Элюирующий буфер	Скорость элюции, мл/мин	V_0 , мл
Sepharose CL-4B	45 × 1.8	0.025 М NH_4HCO_3 , pH 8.0	0.5	35
Sepharose CL-6B	45 × 1.8	0.025 М NH_4HCO_3 , pH 8.0	0.6	35
Sephadex G-50	43 × 2.5	0.025 М пиридин-ацетатный, pH 4.1	0.5	30

2.3.5.2 Газожидкостная хроматография

Состав и соотношение ЖК в исследуемых препаратах анализировали методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), предварительно проводя метилирование образцов в соответствии со статьей (Mayer *et al.*, 1985). Определение МЭЖК проводили по стандартам фирмы Sigma-Aldrich, Inc. (США). Относительное количественное содержание ЖК определяли по доле соответствующих МЭЖК и выражали в процентах к сумме всех идентифицированных пиков на основании соотношения их площадей. Параметры проведения ГЖХ: градиент температуры – от 130°C до 270°C при скорости нагрева 4°C/мин; температура испарителя – 270°C; температура детектора – 300°C; линейная скорость гелия (газа-носителя) – 30.2 см/с; сброс – 1:50.

Состав моносахаридов в выделенных препаратах и их абсолютные конфигурации устанавливали методом ГЖХ в виде их ацетатов полиолов и ацетилированных гликозидов с оптически активным спиртом (R)-2-октанолом. Образцы подготавливали в соответствии с методами, описанными в статьях (Sawardeker *et al.*, 1965; Leontein *et al.*, 1978). Из соотношения площадей выявленных пиков рассчитывали относительное количественное содержание моносахаридов. Параметры проведения ГЖХ: градиент температуры – от 160°C до 290°C при скорости нагрева 7°C/мин; температура

испарителя – 270°C; температура детектора – 300°C; линейная скорость гелия (газа-носителя) – 30.2 см/с; сброс – 1:50.

2.3.6 Колориметрические методы

Долю углеводов в образцах устанавливали по реакции с фенолом и серной кислотой без предварительного гидролиза (DuVois *et al.*, 1956). Строили калибровочную кривую по раствору глюкозы в качестве стандарта.

Определение белков осуществляли по модифицированной методике Бредфорд (Скоупс, 1985). При построении калибровочного графика применяли в качестве стандартного образца раствор бычьего сывороточного альбумина.

Остатки 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (Kdo) выявляли по реакции с тиобарбитуровой кислотой в присутствии диметилсульфоксида (Karkhanis *et al.*, 1978). Количество Kdo рассчитывали по стандартной калибровочной кривой (Захарова и Косенко, 1982).

Анализ препаратов на наличие остатков фосфорной кислоты выполняли согласно Berenblum и Chain (1938), а их содержание устанавливали по калибровочному графику, который строили по стандартному раствору K_2HPO_4 .

2.3.7 Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез образцов проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях при добавлении додецилсульфата натрия (ДСН) (Hitchcock and Brown, 1983). Содержание акриламида в концентрирующем и разделяющем гелях составляло 6 и 15%, соответственно. Перед внесением в лунки геля образцы кипятили на водяной бане (5 мин). Длительность электрофореза составляла приблизительно 90 мин при силе тока 20 мА (концентрирующий гель) и 30 мА (разделяющий гель). После электрофоретического разделения углеводные фракции визуализировали обработкой

гелей раствором нитрата серебра после предварительного периодатного окисления, как описано в работе (Tsai and Frasch, 1982). Окрашивание белковых фракций осуществляли с применением красителя кумасси бриллиантового голубого R-250.

2.3.8 ЯМР-спектроскопия

Методами одномерной (^1H и ^{13}C) и двумерной (COSY, NOESY, TOCSY, ROESY, а также ^1H , ^{13}C HSQC и HMBSC) ЯМР-спектроскопии устанавливали структуры повторяющихся звеньев ОПС/ПС. Пробоподготовка образцов ОПС/ПС к записи спектров включала их лиофилизацию из 99.9% D_2O , проведенную дважды, и перерастворение в 99.96% D_2O . Регистрацию спектров проводили при нагревании до определенной температуры, которая была выбрана на основании положения остаточного сигнала растворителя (HDO). При проведении экспериментов с детектированием протонов остаточный сигнал HDO подавляли предоблучением (продолжительность 1 сек). В качестве внутреннего стандарта использовали 3-триметилсилилпропаноат- d_4 (δ_{H} 0.0, δ_{C} -1.6). В экспериментах TOCSY и ROESY время смешивания составляло 60 и 200 мс, соответственно.

2.3.9 Масс-спектрометрия

После электрофоретического разделения препаратов и визуализации белковых компонентов красителем кумасси бриллиантовым голубым R-250 вырезали окрашенные полоски ПААГ. Проводили промывку вырезанных полосок геля. Для этого использовали деионизованную воду и 40% ацетонитрил в 50 мМ карбонате аммония. Далее выполняли обезвоживание проб при внесении 100% ацетонитрила. После этого образцы высушили. На следующем этапе к высушенным кусочкам геля добавляли по 10 мМ дитиотреитола (ДТТ) в 50 мМ карбонате аммония. Потом образцы экспонировали при 56°C в течение 45 мин. Затем смесь охлаждали и удаляли избыток

жидкости при добавлении 55 мМ йодацетамида в 50 мМ карбонате аммония. После внесения йодацетамида смесь инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Далее проводили инактивацию йодацетамида при помощи 10 мМ ДТТ. Полученные образцы высушивали на вакуумном концентраторе.

К процессированным полоскам геля добавляли трипсин (10 нг/мкл, Sigma-Aldrich, Inc., США). Потом образцы инкубировали при 37°C в течение 16 ч. Инактивацию фермента проводили посредством добавления 10% трифторуксусной кислоты. Экстракцию полученных пептидов выполняли последовательно 2, 25 и 50% растворами ацетонитрила в 50 мМ карбонате аммония. Каждую пробу в ходе выделения выдерживали в ультразвуковой бане в течение 10 мин. В дальнейшем образцы высушивали на вакуумном концентраторе.

Пептиды растворяли в 0.1% трифторуксусной кислоте и наносили по 0.5 мкл на 384-луночную подложку, затем к каждой пробе добавляли по 0.5 мкл α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в 95% ацетонитриле и регистрировали масс-спектры. Белковые молекулы определяли с помощью программной поисковой системы Mascot версии 2.4.2 (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>) в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Применяли предустановленные параметры Mass tolerance (precursor mass tolerance 100 ppm, fragment mass tolerance 0.9 Da). Карбоксиметилирование цистеина и частичное окисление метионина устанавливали, как допустимые модификации. Помимо этого, в качестве допустимого был указан один пропущенный сайт по итогам обработки трипсином. В каждом случае сначала снимался масс-спектр, а затем проводился МС/МС анализ не менее 5 пиков.

2.3.10 Биоинформатический анализ

Отнесение анализируемых белков к определенным семействам и их доменный анализ проводились с применением базы данных InterPro Европейского института биоинформатики (Mitchell *et al.*, 2019), доступной по ссылке <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, а также ресурсов CATH (Sillitoe *et al.*, 2015) и Superfamily (Gough *et al.*, 2001). Для изучения трансмембранной природы белков и определения их

вторичной структуры были использованы онлайн-инструменты MСMBВ (модель цепей Маркова для β -баррелей) (Bagos *et al.*, 2004a) и Pred-TMBВ (метод скрытой модели Маркова) (Bagos *et al.*, 2004b). Согласно данным подходам, если оценка (score) конкретного белка превышает ноль, то с большей долей вероятности такой белок включен во внешнюю мембрану и содержит во вторичной структуре β -баррели.

2.3.11 3D-моделирование

Для моделирования трехмерных структур белков использовали онлайн-сервисы I-TASSER, Phyre2 и LOMETS. Сервер I-TASSER (Yang *et al.*, 2015) по ссылке <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> прогнозирует трехмерные структуры и функции белка с помощью многопоточного выравнивания и подхода *ab initio*. Сервер Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015), который доступен по ссылке <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>, реализует выравнивание скрытых моделей Маркова через HHsearch, что позволяет значительно повысить точность и скорость моделирования. При работе с Phyre2 применялся режим нормального прогнозирования. Мета-сервер LOMETS (Wu and Zhang, 2007) по ссылке <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/> генерирует трехмерные модели путем сбора оценок выравнивания по шаблону из 10 локально установленных программ потоков.

Уточнение 3D моделей осуществляли с помощью алгоритма ModRefiner (Xu and Zhang, 2011), доступного по адресу <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ModRefiner/>. Данный сервер повышает точность структурных белковых моделей путем двухэтапной минимизации энергии на атомном уровне. Созданный в ходе работы сервера файл в формате PDB анализируется с применением графика Рамачандрана.

Полученные трехмерные модели белков были качественно оценены с использованием сервера QMEAN по двум параметрам QMEAN4 и QMEAN6 (Benkert *et al.*, 2011), а также сервера RAMPAGE (Biasini *et al.*, 2014). Сервер QMEAN по ссылке <http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi?page=help> способен выводить как глобальную (т.е. для всей структуры), так и локальную (т.е. для определенного участка)

оценки погрешности на основе одной модели. В дополнение к QMEAN, графики Рамачандрана были также проанализированы при помощи сервера RAMPAGE, доступного по ссылке <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper/rampage.php>.

Трехмерные структуры белков, выбранные по результатам оценки, подвергали структурному выравниванию с применением сервера MultiProt (Shatsky *et al.*, 2004) по ссылке <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MultiProt/>. Данный сервер осуществляет множественное выравнивание трехмерных структур белков, принадлежащих одному и тому же суперсемейству, что позволяет получить данные об участках молекул, обладающих структурным и функциональным сходством. Выравнивание структуры проводили между порином OmpA исследуемых бактерий и порином OmpF бактерий *E. coli* K12 (код PDB: 2ZFG), а также между изучаемым белком OmpW и белком OmpW *E. coli* K12 (коды PDB: 2F1T и 2F1V). Результатом структурного выравнивания является наложение атомных наборов координат в формате PDB и длина выровненных фрагментов с минимальным среднеквадратичным отклонением (RMSD) между структурами. Значение RMSD двух выровненных структур указывает на их сходства или различия. Графически результаты выравнивания были получены с помощью программы Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

2.3.12 Оценка способности белков к образованию амилоидов

Для определения амилоидных свойств исследуемых белков были использованы алгоритмы Waltz (Beerten *et al.*, 2015), Aggrescan (de Groot *et al.*, 2012), доступные в виде онлайн-серверов по ссылкам <http://waltz.switchlab.org/> и <http://bioinf.uab.es/aggrescan/>, соответственно. При работе с данными серверами в качестве исходных данных вносили последовательности белков в формате FASTA. Алгоритм Waltz выполнял анализ при значениях pH 2.6 и 7.0 с разными параметрами прогноза (лучшая общая эффективность, высокая специфичность (т.е. меньше ложноположительных результатов) и высокая чувствительность). Алгоритм Aggrescan проводил анализ амилоидных свойств белков с настройками по умолчанию.

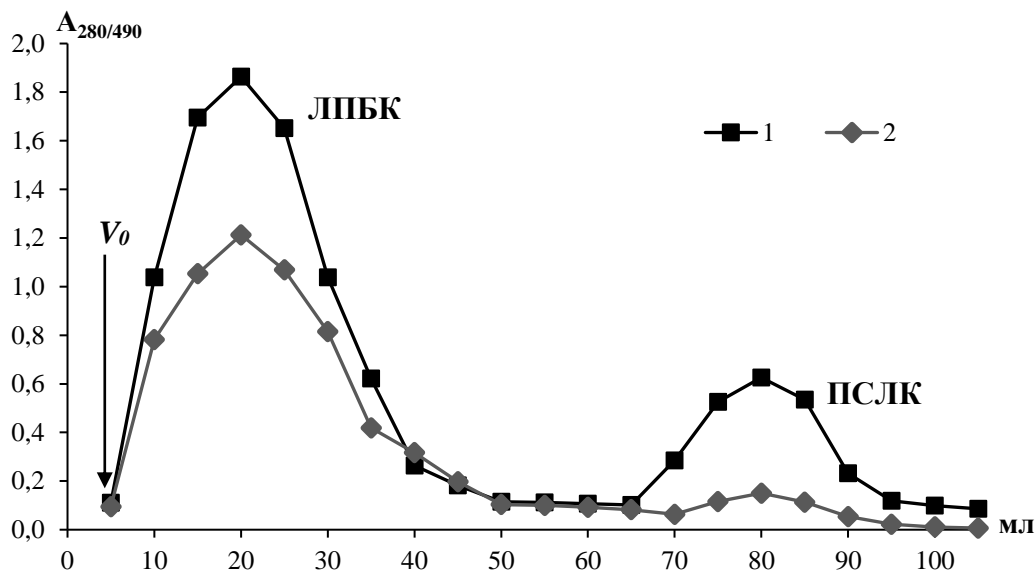
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнедеятельность бактерий в почвенной среде обитания сопровождается постоянной сменой условий окружающей среды, что определяет разнообразие их механизмов адаптации. Защитные реакции бактерий рода *Azospirillum* направлены не только на сохранение жизнеспособности, но и на поддержание устойчивости растительно-микробных ассоциаций при изменении условий существования. К их числу относят: накопление и утилизацию гранул ПГБ при истощении питательных веществ, осмотическом шоке и т.д.; продукцию каротиноидов, участвующих в защите нитрогеназной системы от окислительного стресса; изменение состава ЭПС и КПС, а также модификации их структуры в ответ на колебания рН среды и высушивание (Коннова и др., 2001; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). ЭПС, КПС и ЛПС, ввиду особенностей локализации, могут принимать участие в таких процессах как узнавание, прикрепление и колонизация корней макропартнеров (Michiels *et al.*, 1991; Егоренкова и др., 2001), могут быть вовлечены в агрегирование клеток и последующую флокуляцию (Burdman *et al.*, 1998), а также в формирование биопленок на гидрофильных и гидрофобных поверхностях (Шелудько и др., 2008). Вариабельность их состава и свойств является важным критерием успешной адаптации бактерий рода *Azospirillum* к негативным воздействиям среды. Настоящая работа посвящена характеристике структурных особенностей ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и исследованию влияния различных параметров культивирования на состав экстраклеточных и мембранных гликополимеров *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4.

3.1 Характеристика структуры ЛПБК из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245

С поверхности клеток *A. baldaniorum* Sp245, культивируемых в питательной среде с малатом натрия, получили капсульный материал, выход которого в расчете на сухую биомассу клеток составил 6%. Из капсулы исследуемого штамма с помощью гель-фильтрации на колонке с Sepharose CL-4B выделили фракцию ЛПБК, которая

элюировались с холостым объемом колонки, и следующая за ней слабовыраженная фракция ПСЛК (Рисунок 1). Условия проведения и параметры гель-фильтрации указаны в разделе 2.3.5.1.



$A_{280/490}$ – оптическая плотность продуктов реакции элюата с фенолом и серной кислотой при $\lambda = 490$ нм (1 – детекция углеводов) и элюата при $\lambda = 280$ нм (2 – детекция белков),
 V_0 – нулевой объем колонки.

Рисунок 1 – Профиль элюции КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 после гель-фильтрации на колонке с Sepharose CL-4B

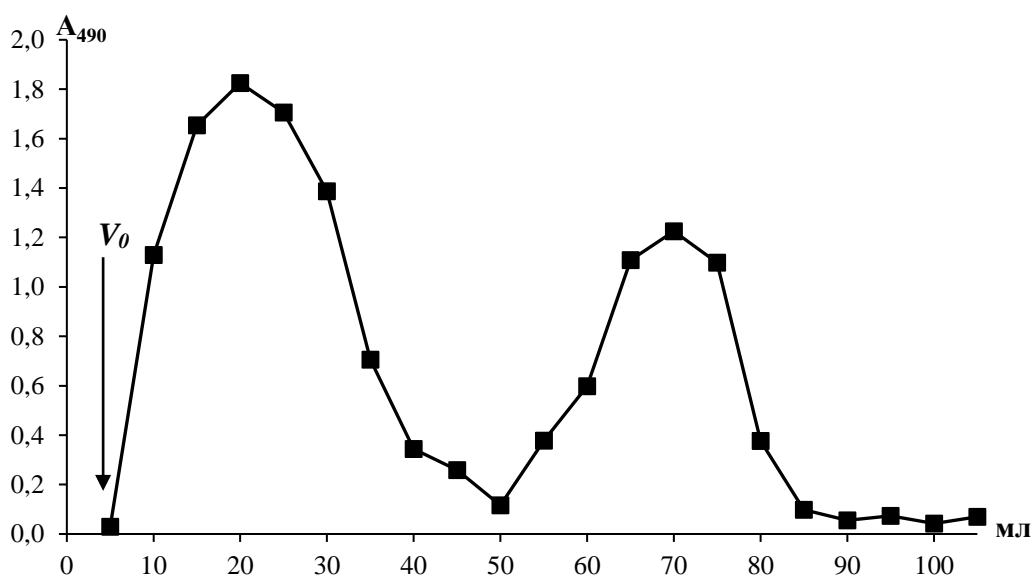
Выходы препаратов ЛПБК и ПСЛК составили 1 и 0.3%, соответственно, от высушенной биомассы клеток. Для дальнейших исследований использовали преобладающую в КПС бактерий штамма Sp245 фракцию ЛПБК.

3.1.1 Анализ структуры ПС, выделенного из ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Анализ химического состава показал наличие в образце ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245 углеводов (~40%), в том числе Kdo (~2%), белков (~16.5%) и остатков фосфорной кислоты (~3%). Липидная фракция ЛПБК включала остатки

следующих ЖК: 3-ОН-С14:0 (~23%), С16:0 (~9%), 3-ОН-С16:0 (~18%), С18:1 (~26%) и С19:0 (~24%).

Преобладающим моносахаридом в ЛПБК данного штамма являлась D-Rha, содержание которой составляло 98% от суммы идентифицированных пиков. Препарат ЛПБК гидролизовали и фракционировали гель-фильтрацией на колонке с Sephadex G-50. В результате разделения выделили высокомолекулярный ПС (Рисунок 2), структуру которого установили методом ЯМР-спектроскопии.



A_{490} – оптическая плотность продуктов реакции элюата с фенолом и серной кислотой при $\lambda = 490$ нм, V_0 – нулевой объем колонки.

Рисунок 2 – Профиль элюции ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на колонке с Sephadex G-50 после мягкого кислотного гидролиза

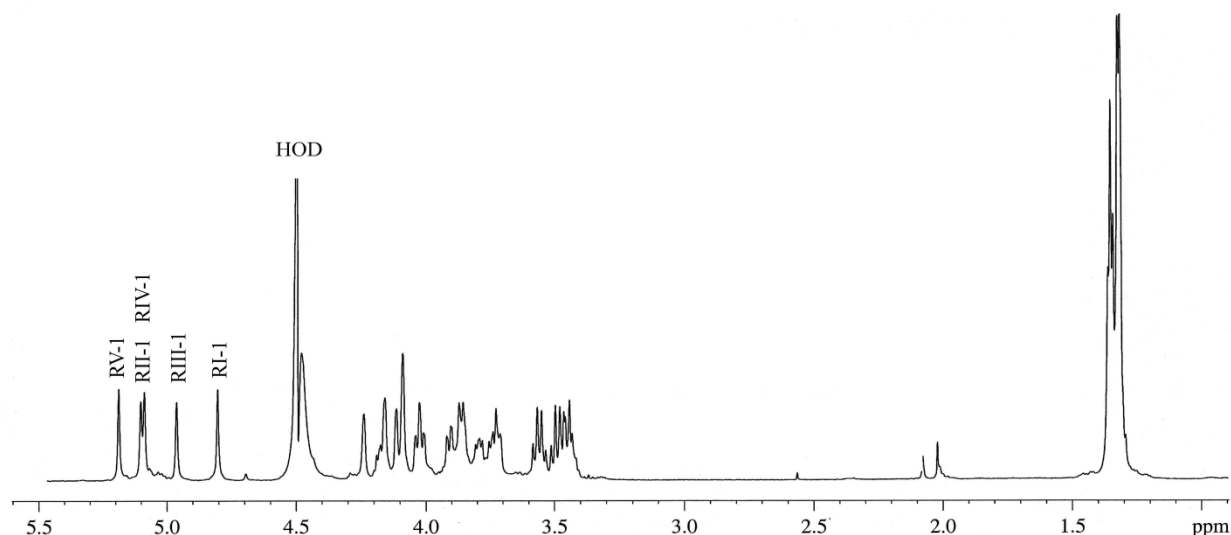
По данным ^{13}C -ЯМР спектров (Таблица 4) в составе ПС обнаружили сигналы пяти аномерных атомов углерода (97.8-103.3 м.д.), метильных групп пяти остатков D-Rha (17.8-17.9 м.д.) и двадцати сигналов атомов углерода моносахаридных циклов (68.4-79.0 м.д.). По данным спектров ^1H -ЯМР (Рисунок 3), соответственно, ПС содержал сигналы пяти аномерных протонов (4.82-5.20 м.д.), пяти метильных групп D-Rha (1.30-1.33 м.д.) и протонов моносахаридных колец (3.43-4.25 м.д.). Сходные спектры были получены для ОПС из ЛПС внешней мембраны гомологичного штамма, структура которого была определена в работе (Fedonenko *et al.*, 2002). Таким образом, бактерии *A. baldaniorum* Sp245 при выращивании в среде, содержащей малат натрия, на протяжении 24 ч

синтезируют молекулы ЛПБК с идентичной молекулам ЛПС структурой полисахаридной компоненты с повторяющимся звеном $\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{IV}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{V}}\text{-(1}\rightarrow$.

Таблица 4 – Данные спектров ^1H и ^{13}C -ЯМР образца ПС, полученного из ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245 (δ , м.д.)

Моносахаридный остаток	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6
$\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow$	4.80 98.0	4.07 78.9	3.71 74.6	3.42 73.5	3.41 73.8	1.31 18.0
$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow$	5.09 103.2	4.23 68.6	4.01 78.4	3.53 71.7	3.84 70.4	1.31 17.9
$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow$	4.96 103.1	4.14 71.1	3.85 79.1	3.55 72.6	3.79 70.6	1.30 17.9
$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{IV}}\text{-(1}\rightarrow$	5.10 101.9	4.10 79.4	3.90 71.1	3.46 73.6	3.72 70.5	1.28 17.9
$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{V}}\text{-(1}\rightarrow$	5.19 101.4	4.10 79.5	4.01 71.1	3.49 73.6	4.18 70.1	1.27 17.8

Изучение серологических свойств О- и К-антигенов бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при использовании поликлональных антител к целым клеткам азоспирилл, обработанным глутаровым альдегидом, не обнаружило между молекулами ЛПС и КПС существенных отличий в антигенных свойствах (Матора и Щёголев, 2002). Этот факт указывает не только на химическую, но и на серологическую идентичность данных гликополимеров поверхности. Однако, оказалось, что не все штаммы бактерий рода *Azospirillum* проявляют выраженную консервативность структуры и антигенных свойств в случае молекул ЛПС и КПС. Применение поликлональных антител к очищенным препаратам ЛПС и их использование в экспериментах с нативными клетками выявило снижение степени сродства данных антител к макромолекулам поверхности клеток *A. brasilense* Cd, покрытых капсулой, по сравнению с бескапсульными клетками (Коннова и др., 2006).



Арабские цифры соответствуют протонам в моносахаридных остатках: R, Rha.

Рисунок 3 – Спектр ^1H -ЯМР препарата ПС из ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245

В случае бактерий *A. lipoferum* Sp59b, а также другого обитателя ризосферы – *Niveispirillum irakense* KBC1 (ранее *A. irakense* KBC1) – взаимодействия поликлональных антител к ЛПС с интактными клетками не наблюдалось. В ходе дальнейших исследований выяснилось, что ПС из КПС бактерий *A. lipoferum* Sp59b имел структуру, отличную от гомологичного ОПС (Смолькина и др., 2010), но сходную с таковой для ОПС бактерий *A. lipoferum* SR5, SR16, SR38, SR61, SR66 и SR98 (Федоненко и др., 2015). Однако, ПС и ОПС штамма *N. irakense* KBC1 имели в своем составе идентичные повторяющиеся олигосахаридные звенья, однако ассоциирование белковой составляющей капсулы с ПС, вероятно, приводило к частичному или полному экранированию антигенных детерминант, что в итоге препятствовало их взаимодействию с антителами (Fedonenko *et al.*, 2013).

Несмотря на то, что ПС капсульных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 демонстрируют структурную и антигенную идентичность, были выявлены различия в их биологической активности. Так, образцы ЛПС, в отличие от образцов КПС, не связывались с молекулами АЗП (Егоренкова и др., 2001; Konnova and Ignatov, 2003). Данный факт, возможно, обусловлен выраженной гетерогенностью капсульного материала и наличием в его составе небольшого количества углеводсодержащих примесей, которые проявляют сродство к АЗП. Такой эффект, может объясняться тем, что КПС и ЛПС принимают участие на разных этапах формирования растительно-микробных ассоциаций. Возможно, различные стратегии

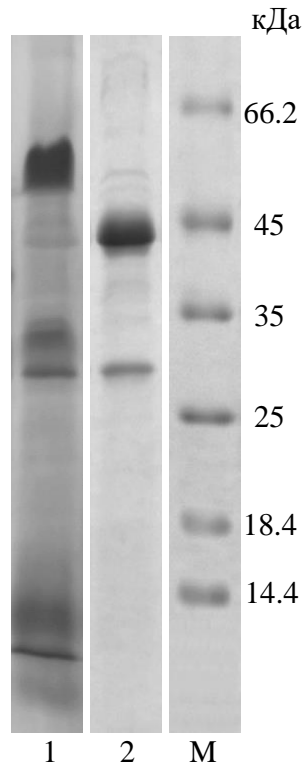
взаимодействия азоспирилл с растениями (эндо- и эктосимбиоз) обуславливают продукцию либо сходных по строению, но различающихся по биологической активности ЛПС и КПС, как у штамма *A. baldaniorum* Sp245, либо синтез индивидуальных О- и К-антигенов, как у бактерий *A. lipoferum* Sp59b.

3.1.2 Характеристика белков в ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245

На биологическую активность ЛПБК азоспирилл существенное влияние оказывают ассоциированные с молекулами ЛПС белки, о составе и структуре которых на момент начала исследования информация отсутствовала.

Денатурирующий электрофорез в ПААГ выявил в составе ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245 два преобладающих белка с массами ~30 и 42 кДа (Рисунок 4). Проведенные ранее исследования ЛПБК капсул бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и S17 (Konnova and Ignatov, 2003) и *A. lipoferum* Sp59b (Смолькина и др., 2010) также продемонстрировали наличие превалирующей белковой фракции с кажущейся молекулярной массой в диапазоне 40-42 кДа.

Для идентификации белки ЛПБК исследуемого штамма были экстрагированы из ПААГ и проанализированы методом МАЛДИ масс-спектрометрии с помощью поискового алгоритма MASCOT. Применительно к белку с кажущейся молекулярной массой 42 кДа обнаружили два совпадения, аннотированные как OmsA, основной белок наружной мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (40.9 кДа), и предшественник белка OmsA бактерий *A. brasilense* Sp7 (40.8 кДа). Оба белка состоят из 390 аминокислотных остатков, и их парное выравнивание с помощью алгоритма EMBOSS needle и эмпирической модели замен с матрицей EBLOSUM62 выявило 99.5% идентичность с отличиями в положениях аминокислотных остатков 88 и 373. Анализ данных белков с помощью программы BLAST показал, что обнаруженные белки принадлежат к суперсемейству поринов.



1 – окрашивание на углеводы; 2 – окрашивание на белки; М – белковые маркеры.

Рисунок 4 – Электрофореграмма образца ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245

Для белка с кажущейся молекулярной массой 30 кДа удалось выявить один значимый результат – канал-образующий OmpW-подобный белок внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (24.8 кДа), состоящий из 232 аминокислотных остатков.

Белковые домены идентифицированных полипептидов проанализировали в онлайн-системе Inter-Pro. В OmpW-подобном белке (IPR005618) капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 было обнаружено два домена. Первый из них находится в пределах 32-232 аминокислотных остатков и представляет собой β -баррель внешнего белка/фермента PagP (IPR011250). Второй домен локализован внутри первого между 104 и 199 аминокислотными остатками и представляет собой домен β -барреля внешнего автотранспортного белка (IPR006315).

Для белка капсулы OmaA известные домены или повторяющиеся фрагменты не были обнаружены в ходе анализа стандартными пакетами Inter-Pro. База данных CATN распознала данный белок как член суперсемейства поринов (2.40.160.10), в то время как по классификации EMBL-EBI белок OmaA относится к семейству «Porin_4» (PF13609). Аналогичный результат получили при использовании библиотеки скрытых моделей Маркова, реализованных в онлайн-системе «Superfamily 1.75». Согласно базе данных

SCOP (структурная классификация белков) белок OmaA может быть отнесен к надсемейству поринов (SCOP ID 56935) и к четырем семействам: порины (SCOP ID 56936), мальтопорин-подобные белки (SCOP ID 56942), лиганд-зависимые ионные каналы (SCOP ID 56948) и транспортные белки наружной мембраны (SCOP ID 111361).

Для анализа трансмембранной природы изучаемых белков использовали несколько статистических подходов, в частности, модель цепей Маркова и скрытая модель Маркова, которые позволяют выявить определенные аминокислотные последовательности, благоприятные для закрепления и локализации белков в мембране. Первоначально проанализировали последовательности белков OmpW и OmaA с помощью программы MСMBV (модель цепей Маркова для β -баррелей). Полученные значения score были равны 0.039 для OmpW и 0.068 для OmaA, что подтверждает трансмембранную природу данных белков. Кроме того, применение ресурса Pred-TMBV с методом скрытой модели Маркова, также подтвердило высокую вероятность локализации данных белков в наружной мембране бактерий. Сервис Pred-TMBV позволил смоделировать положение изучаемых белков в мембране (Рисунок 5).

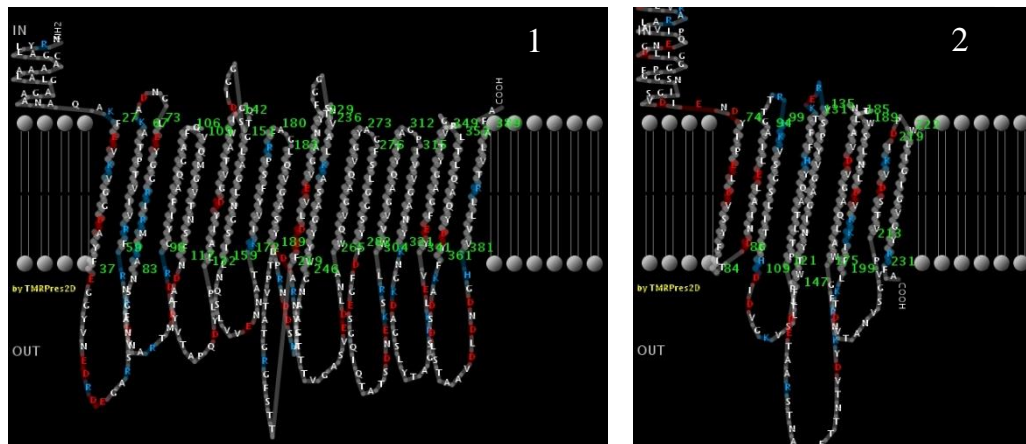


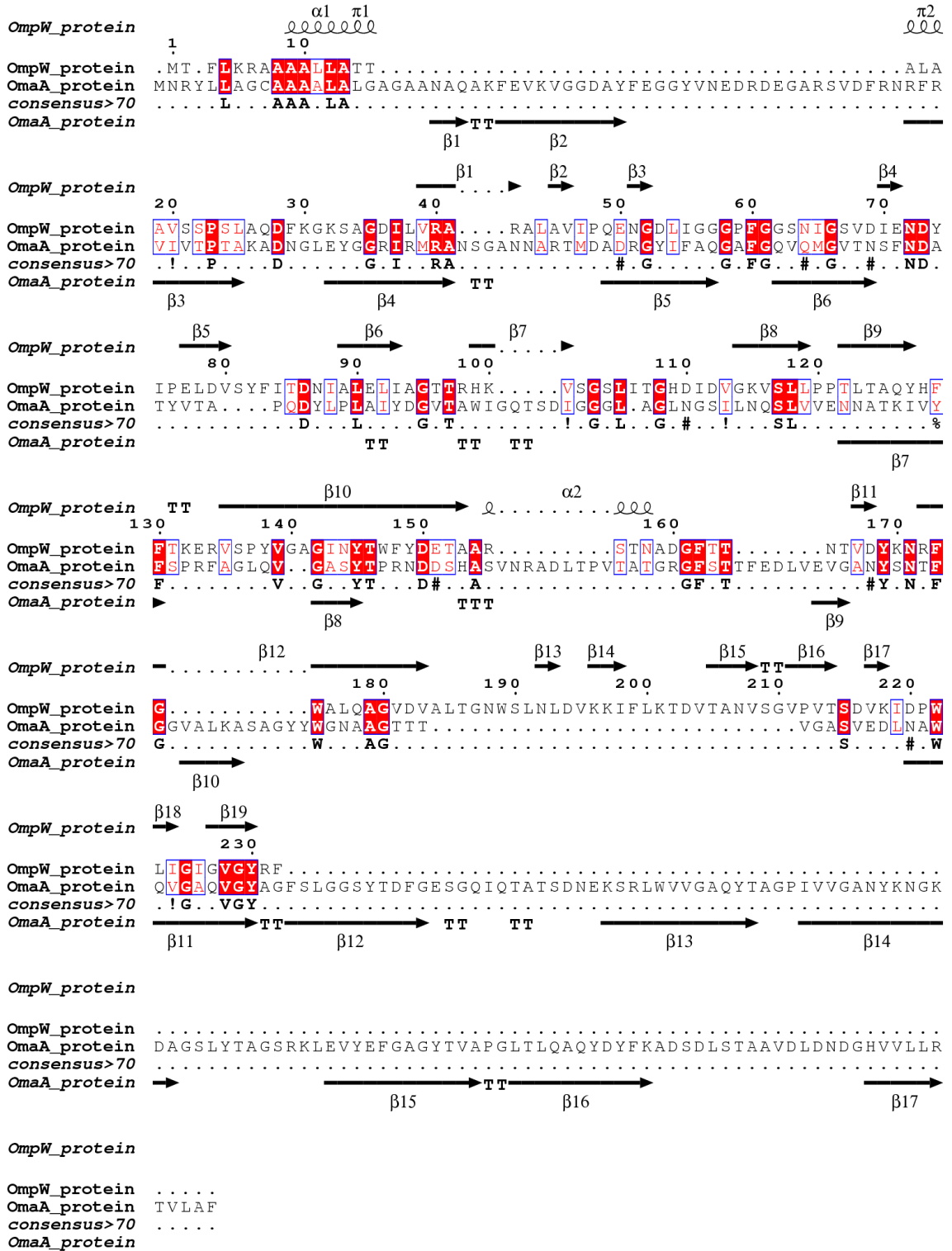
Рисунок 5 – Модели возможной локализации белков OmaA (1) и OmpW (2) в наружной мембране (получены с помощью сервиса Pred-TMBV)

Исходя из полученных моделей было обнаружено, что белок OmaA имеет гораздо большую длину последовательности, которая включена в мембрану, в отличие от OmpW, что указывает на разные механизмы рецепции транспортируемых ими молекул и их дальнейшего функционирования в клеточной стенке бактерий. Парное выравнивание белков OmpW и OmaA позволило выявить в их составе несколько идентичных сайтов, при этом сравнение их вторичных структур не установило

определенного сходства (Рисунок 6). В аминокислотных последовательностях данных белков имеются несколько коротких областей с тремя α -спиралями и многочисленными β -складчатыми слоями, что свидетельствует о тенденции к формированию различных типов β -структур. Белок OmaA содержит в негомологичных по отношению к белку OmpW областях дополнительные β -складчатые структуры. Данный факт подтверждается результатом анализа исследуемых белков программой Pred-TMBV, который продемонстрировал наличие большего количества трансмембранных петель в OmaA, по сравнению с OmpW-подобным белком. Таким образом, белки ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 обладают низкой гомологией, но, в то же время, характеризуются определенными сходствами вторичной структуры, что может указывать на общие черты их функционирования.

Трехмерные модели структуры белков OmaA и OmpW получили с использованием онлайн-ресурсов, в том числе подхода к моделированию иерархической гомологии (I-TASSER), некоторых усовершенствованных методов удаленного обнаружения гомологии для построения трехмерных моделей на основе прогнозирования сайтов связывания лигандов и анализа влияния различных вариантов аминокислот (Phyre2), а также нескольких алгоритмов мета-сервера (LOMETS). Для каждого изучаемого белка Phyre2 предсказывал одну трехмерную модель, I-TASSER – 5 моделей, а мета-сервер LOMETS – 10 моделей. Полученные при помощи указанных ресурсов модели были доработаны с использованием сервиса ModRefiner. Качество I-TASSER моделей белков OmaA и OmpW по сравнению с моделями других ресурсов было значительно ниже. Наиболее удачные I-TASSER модели имели значения параметра «предпочтительный участок» 86.6% для белка OmaA и 84.8% для OmpW-подобного белка. Параметр «процент выброса», который представляет собой возможные ошибки при построении 3D структуры белков, для I-TASSER моделей был наибольшим среди остальных моделей и составлял 3.9% и 7.8% для белков OmaA и OmpW, соответственно.

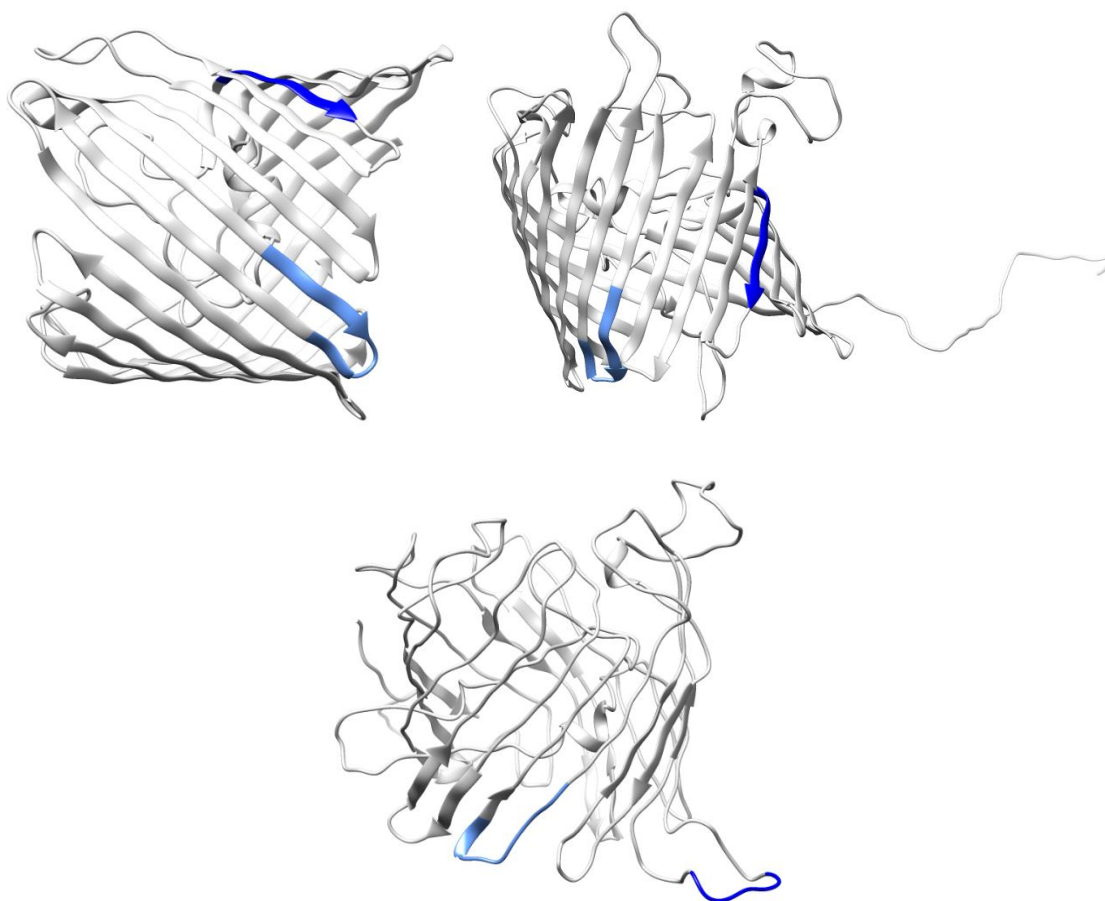
Модели, полученные с помощью Phyre2, показали лучшие результаты по сравнению с I-TASSER моделями. Параметр «предпочтительный участок» моделей Phyre2 достигал значений 92.4% в случае белка OmaA и 95.0% в случае OmpW-подобного белка. Оценки «процента выброса» для моделей Phyre2 составляли 2.5% и 3.0% для изучаемых белков OmaA и OmpW, соответственно. Наилучшие результаты при



Участки вторичной структуры, смоделированные с помощью PSS PRED показаны в верхней и нижней частях каждой последовательности; стрелки обозначают β -листы, а спирали – α -спирали. Красные прямоугольники показывают идентичность аминокислот в обеих последовательностях, а белые – сходство.

Рисунок 6 – Парное выравнивание аминокислотных последовательностей белков *OmpW* и *OmaA* с использованием ресурса ESPrnt 3.0

построении моделей белков ЛПБК в соответствии с оценкой параметра «предпочтительный участок» были получены на мета-сервере LOMETS с использованием алгоритма MUSTER (LOMETS 3). Минимальные значения «процента выброса» были достигнуты в случае SP3 (LOMETS 8) для OmaA (0.8%) и PROSPECT2 (LOMETS 5) для OmpW (0.0%) (Рисунки 7 и 8).

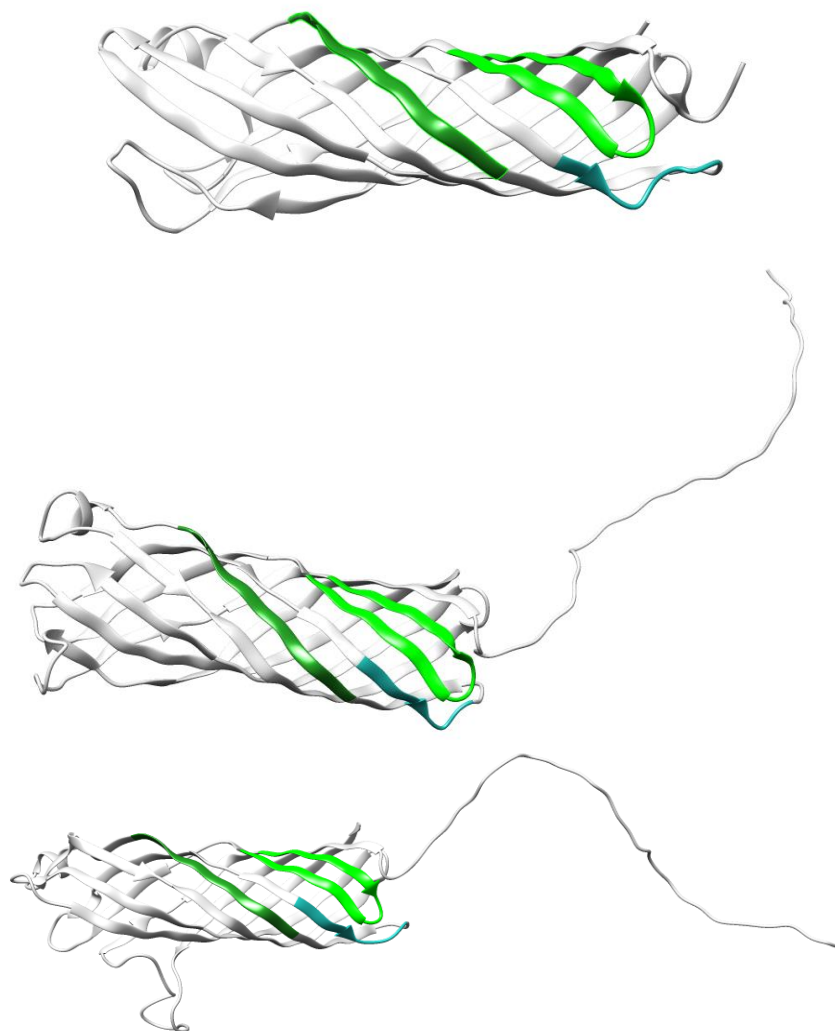


Различными оттенками синего выделены три области с высокой тенденцией к образованию β -амилоидных структур.

Рисунок 7 – Трехмерные модели белка OmaA, полученные с использованием алгоритмов Phyre2 (сверху слева), LOMETS 3 (сверху справа) и LOMETS 8 (внизу)

Показатель QMEAN4 конкретной модели рассчитывается как линейная комбинация из четырех статистически потенциальных членов и преобразуется в Z-показатель, относящийся к рентгеновским структурам высокого разрешения аналогичного размера. Показатель QMEAN6 доступен в загружаемых архивах и включает оценки совпадения прогнозов на основе профиля полученной модели. Оба

показателя QMEAN4 и QMEAN6 коррелируют с соответствующими параметрами, полученными из анализа графиков Рамачандрана, поэтому более точные модели, согласно RAMPAGE, получают более высокие оценки QMEAN (Таблицы 5 и 6).



Различными оттенками зеленого выделены три области с высокой тенденцией к образованию β -амилоидных структур.

Рисунок 8 – Трехмерные модели OmpW-подобного белка, полученные с использованием алгоритмов Phyre2 (сверху), LOMETS 3 (в центре) и LOMETS 5 (внизу)

Таблица 5 – Результаты оценки моделей белка OmaA, полученные при использовании различных алгоритмов

Модель и алгоритм	Процент выброса	Разрешенный участок	Предпочтительный участок	QMEAN4	QMEAN6
Phyre2	2.5%	5.1%	92.4%	0.5038	0.5301
I-TASSER 1	3.9%	15.7%	80.4%	0.3921	0.4483
I-TASSER 2	3.1%	11.1%	85.8%	0.4412	0.4528
I-TASSER 3	3.9%	10.8%	85.3%	0.4305	0.4741
I-TASSER 4	3.1%	10.6%	86.3%	0.4553	0.4797
I-TASSER 5	2.3%	11.1%	86.6%	0.4411	0.4768
LOMETS 1	1.3%	5.9%	92.8%	0.5114	0.5198
LOMETS 2	3.1%	7.0%	89.9%	0.4454	0.4429
LOMETS 3	2.1%	3.6%	94.3%	0.5376	0.5310
LOMETS 4	1.8%	6.7%	91.5%	0.4667	0.4864
LOMETS 5	1.0%	6.2%	92.8%	0.5323	0.5180
LOMETS 6	2.3%	4.6%	93.0%	0.5205	0.5253
LOMETS 7	1.0%	5.7%	93.3%	0.5452	0.5461
LOMETS 8	0.8%	9.0%	90.2%	0.5473	0.4809
LOMETS 9	1.8%	4.9%	93.3%	0.5106	0.4825
LOMETS 10	2.3%	5.9%	91.8%	0.5056	0.5004

Для дальнейшего анализа 3D структур исследуемых белков выбрали их Phyre2 модели, а также модели LOMETS 3 и LOMETS 8 для белка OmaA и LOMETS 3 и LOMETS 5 для OmpW-подобного белка.

Таблица 6 – Результаты оценки моделей OmpW-подобного белка, полученные при использовании различных алгоритмов

Модель и алгоритм	Процент выброса	Разрешенный участок	Предпочтительный участок	QMEAN4	QMEAN6
1	2	3	4	5	6
Phyre2	3.0%	2.0%	95.0%	0.5749	0.5822
I-TASSER 1	7.8%	10.0%	82.2%	0.4118	0.4589
I-TASSER 2	6.5%	9.6%	83.9%	0.4211	0.4470
I-TASSER 3	7.0%	11.3%	81.7%	0.4212	0.4350
I-TASSER 4	7.4%	10.9%	81.7%	0.3407	0.3803
I-TASSER 5	3.0%	12.2%	84.8%	0.4682	0.4660

Окончание Таблицы 6

1	2	3	4	5	6
LOMETS 1	0.9%	3.0%	96.1%	0.5935	0.5557
LOMETS 2	0.9%	4.3%	94.8%	0.6101	0.5838
LOMETS 3	0.9%	1.7%	97.4%	0.6083	0.5779
LOMETS 4	1.3%	3.5%	95.2%	0.6093	0.5726
LOMETS 5	0.0%	4.3%	95.7%	0.6279	0.5885
LOMETS 6	2.2%	3.5%	94.3%	0.6058	0.5749
LOMETS 7	2.6%	3.5%	93.9%	0.6122	0.5885
LOMETS 8	1.3%	2.6%	96.1%	0.6097	0.5823
LOMETS 9	1.3%	2.6%	96.1%	0.6000	0.5713
LOMETS 10	2.2%	3.0%	94.8%	0.5946	0.5635

Анализ структурного выравнивания позволяет установить функциональное сходство белков, различающихся по аминокислотным последовательностям. Результаты данного выравнивания применительно к исследуемым белкам представлены в Таблице 7. Наибольшее сходство с белком OmaA проявлял порин, обозначенный как 2ZFG в PDB с заголовком «порин OmpF». Для данного белка, выделенного из наружной мембраны бактерий *E. coli* MH225, ранее была определена пространственная структура методом рентгеноструктурного анализа (Yamashita *et al.*, 2008). Сравнение Phyre2 модели белка OmaA и модели порина OmpF показало, что несмотря на различия в первичной структуре, способы укладки этих белков довольно похожи. Область структурного сходства этих белков содержит 236 аминокислотных остатков со значениями RMSD 1.52 Å, что сопоставимо с точностью дифракции рентгеновских лучей, и включает шестнадцать β-складчатых структур, один α-спиральный мотив внутри β-барреля, а также случайный спиральный фрагмент, связывающий данные части молекулы белка. Подобное выравнивание свидетельствует о том, что алгоритм построения моделей Phyre2 хорошо подходит для изучаемых нами белков.

Т.к. аналоги исследуемого OmpW-подобного белка известны по данным рентгеноструктурного анализа как тримеры, мы использовали каждую цепь (обозначенные А, В и С, соответственно) для попарного сравнения, чтобы выявить наилучшие результаты при структурном выравнивании (Таблица 7). При анализе белка 2F1T (Hong *et al.*, 2006) с цепями А, В и С в составе (по 14 нитей в каждой) получили выравненные фрагменты со значениями RMSD 0.26 Å. В свою очередь, другой аналог

порина OmpW, белок 2F1V в кристаллическом состоянии состоял из шести субъединиц (14 нитей в каждой цепи) (Hong *et al.*, 2006), которые были идеально выровнены друг с другом со значениями RMSD 0.01 Å, поэтому для сравнения моделей использовалась только одна цепь (цепь A).

Таблица 7 – Результаты структурного выравнивания моделей белков OmaA и OmpW с моделями известных белков с указанием минимальных значений RMSD (Å)

OmaA	Phyre2	LOMETS 3	LOMETS 8
2ZFG	236 (1.52)	233 (1.42)	237 (1.95)
OmpW	Phyre2	LOMETS 3	LOMETS 5
2F1V (цепь A)	171 (1.19)	169 (1.27)	178 (0.79)
2F1T (цепь A)	173 (1.15)	172 (1.28)	179 (0.62)
2F1T (цепь B)	175 (1.18)	173 (1.25)	179 (0.71)
2F1T (цепь C)	174 (1.18)	170 (1.22)	179 (0.71)

Амилоиды представляют собой белковые агрегаты фибриллярной формы с высокоупорядоченной «кросс-бета» структурой, участвующие в развитии амилоидозов – неизлечимых заболеваний у животных и человека. Однако, исследования последних лет показали, что данные белковые агрегаты играют важную биологическую роль в жизнедеятельности про- и эукариот, а также архей (Нижников и др., 2015; Nizhnikov *et al.*, 2016). Поскольку белки OmaA и OmpW содержат значительное количество β-складчатых фрагментов, было высказано предположение о вероятности формирования ими амилоидоподобных фибрилл. Основанием для этого послужили данные о том, что ряд белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий проявляют свойства амилоидов, или же являются белками-предшественниками амилоидов (amyloid precursor proteins, APP) (Sahaya Rajan *et al.*, 2016; Montes García *et al.*, 2018).

На сегодняшний день существует множество алгоритмов, основанных на разных подходах для оценки способности белков к образованию амилоидоподобных агрегатов с участием β-структурированных фрагментов белка. Наиболее часто в подобных исследованиях используют алгоритмы Waltz и Aggrescan. Предиктор Aggrescan использует для анализа исключительно эмпирические данные, полученных *in vivo*. Алгоритм Waltz в основном строит матрицу оценки позиции (position-specific scoring matrix, PSSM), предназначенную для идентификации в последовательности белка детерминант агрегации в амилоидоподобных структурах.

Анализ белка OmaA с помощью алгоритма Aggrescan выявил 18 «горячих точек» в аминокислотной последовательности с усредненным значением способности к агрегации аминокислот (параметр «a3v Sequence Average») равным -0.049 (Таблица 8). Термин «горячая точка» определяется как область с пятью или более аминокислотными остатками в последовательности с параметром «a4v», превышающим пороговое значение -0.02 без учета пролина, который действует как терминатор агрегации. Отрицательное значение параметра «a3vSA» означает, что белок OmaA имеет меньшую склонность к агрегации, чем среднее число белков, занесенных в используемую базу данных SwissProt.

Согласно анализу Aggrescan, OmpW-подобный белок содержит меньше областей, благоприятных для формирования амилоидоподобных структур (11 «горячих точек»), чем белок OmaA, однако обладает положительным значением параметра «a3vSA» (0.076) (Таблица 8).

Таблица 8 – Анализ белков OmaA и OmpW с помощью алгоритма Aggrescan

Параметры анализа	OmaA	OmpW
a3v Sequence Average (a3vSA)	-0.049	0.076
Number of Hot Spots (nHS)	18	11
Normalized nHS for 100 residues (NnHS)	4.615	4.741
Area of the profile Above Threshold (AAT)	38.737	34.991
Total Hot Spot Area (THSA)	35.174	31.077
Total Area (TA)	-12.81	19.513
AAT per residue (AATr)	0.099	0.151
THSA per residue (THSAr)	0.09	0.134
Normalized a4v Sequence Sum for 100 residues (Na4vSS)	-5.2	6.5

Несмотря на то, что белки OmaA и OmpW существенно различаются между собой по длине и аминокислотной последовательности, нормализованные параметры (разделенные на количество остатков аминокислот в исходной последовательности), рассчитанные по алгоритму Aggrescan, очень близки, что, вероятно, может объясняться сходными функциями, которые выполняют данные белки в наружной мембране бактерий.

Общая площадь профилей агрегации (aggregation profiles, TA) белков OmaA и OmpW, рассчитанных по исходной аминокислотной последовательности с

трапецеидальной интеграцией, близка по абсолютной величине для обоих белков, но, в то же время, противоположна по знаку. Этот факт позволяет предположить высокую склонность OmpW-подобного белка к β -структурированию и, как следствие, к формированию амилоидоподобных сборок.

Использование алгоритма прогнозирования Waltz для конкретной позиции, позволяет уменьшить количество возможных областей с β -структурой у исследуемых белков и уточнить результаты работы алгоритма Aggrescan (Таблица 9). Для белка OmaA с использованием алгоритма Waltz на уровне «Наибольшая эффективность» выявлено пять областей, две из которых были ранее получены с помощью Aggrescan в сходных позициях последовательности. Применение «высокоспецифичного» режима в алгоритме Waltz обнаружило только одну значимую для формирования β -амилоида структуру, состоящую из аминокислот в диапазоне 172-177. Данная область, содержит 6-10 аминокислотных звеньев в зависимости от используемого предиктора, и является относительно короткой для образования β -амилоидной упаковки. Используемые алгоритмы позволили получить схожие результаты, подтверждающие низкую способность белка OmaA к образованию амилоидоподобных структур. В случае OmpW-подобного белка алгоритмом Waltz были выделены три области, выявленные на уровне «Наибольшая эффективность», которые ранее были предсказаны с помощью Aggrescan. При «высокоспецифичном» режиме в алгоритме Waltz область от 125 до 131 аминокислоты была исключена из анализа, поскольку, согласно всем используемым алгоритмам, была слишком короткой (5-7 аминокислотных звеньев). Две другие области, от 78 до 94 и от 141 до 150 аминокислот, являются более протяженными, что может определять возможность образования ими β -амилоидных структур.

Таким образом, используемые алгоритмы Aggrescan и Waltz позволили сделать вывод, что вероятность образования β -амилоидных структур для OmpW-подобного белка была более выражена в сравнении с белком OmaA.

Таблица 9 – Результаты анализа белков OmaA и OmpW с помощью алгоритмов Aggrescan и Waltz (совпадающие последовательности выделены жирным шрифтом)

Алгоритм Aggrescan					Алгоритм Waltz				
Start AA	Stop AA	Длина	Последовательность	HSA	Start AA	Stop AA	Длина	Последовательность	Score
OmaA									
168	177	10	NNAT KIVYFS	2.835	172	177	6	KIVYFS	98.662207
267	281	15	VGA QVGYAGFSLGGS	2.959	269	277	9	AQVGYAGFS	92.64214
OmpW									
77	94	18	ELDVS YFITDNIALELIA	5.856	78	94	17	LDVSYFITDNIALELIA	96.989967
125	129	5	AQYHF	1.120	125	131	7	AQYHFFT	96.32107
138	150	13	YVGAGIN YTWFYD	3.820	141	150	10	AGINYTWFYD	93.979933-97.993311

На рисунках 7 и 8 представлены трехмерные модели белков OmpW и OmaA, полученные с использованием Phyre2 и различных алгоритмов LOMETS, с выделенными областями, которые проявляют высокую тенденцию к образованию β -амилоидных структур. В моделях OmpW-подобного белка, можно заметить, что предсказанные области, благоприятные для β -амилоидного структурирования, являются обширными, содержат небольшие повороты и расположены в фрагменте β -барреля близко друг к другу стерически. Данный факт дает основание предполагать, что прогноз алгоритмов Aggrescan и Waltz был достаточно надежным. Напротив, визуализация расположения благоприятных для β -амилоидных структур областей в моделях белка OmaA показала наличие β -организованных фрагментов на двух из трех используемых моделях. Кроме того, предсказанные β -структуры данного белка стерически разделены, и его амилоидоподобная сборка представляется маловероятной, что согласуется с результатами анализа Aggrescan.

Амилоиды были обнаружены в протеоме более 80 видов представителей отряда *Rhizobiales*. Данные белки обладают широким набором функций, среди которых формирование биопленок, адгезия бактерий к различным поверхностям, сборка жгутиков, экскреция сидерофоров, биосинтез ЛПС, а также реализация молекулярных основ бобово-ризобиального симбиоза (Antonets *et al.*, 2018). Применительно к клубеньковым бактериям *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* штамма RCAM1026 было показано, что белки мембраны RopA и RopB, обнаруженные в составе капсульного материала, образуют амилоидные фибриллы, в том числе в экспериментах *in vivo* (Kosolapova *et al.*, 2019). Продукция в капсулу бактерий *A. baldaniorum* Sp245 белков внешней мембраны, которые обладают свойствами амилоидов, указывает на сходство в пространственной организации капсульных чехлов у различных групп ризобактерий.

Белок OmaA выступает в качестве основного белка наружной мембраны азоспирилл и способен играть роль адгезина как при флокуляции клеток, так и при заселении корней растений (Burdman *et al.*, 2001). Функция OmpW-подобного белка для азоспирилл пока недостаточно изучена. Однако, в отношении *E. coli* известно, что белок OmpW выполняет протекторную функцию, направленную на защиту бактерий от фагоцитоза в организме хозяина (Wu *et al.*, 2013).

Продукция белка OmpA в капсулу, вероятно, является специально выработанной адаптационной стратегией, поскольку данный белок принимает непосредственное участие в колонизации корневой системы растений. Такой подход позволяет максимально интенсифицировать процесс заселения корней и, как следствие, повысить эффективность функционирования растительно-микробной ассоциации.

Таким образом, нами была продемонстрирована идентичность структур повторяющихся звеньев ПС, полученных из ЛПС и ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245, а также обнаружены два белка в составе ЛПБК. Порин OmpA является многофункциональным и вовлечен в начальные стадии становления растительно-бактериального консорциума. Функции OmpW-подобного белка в составе капсульного материала бактерий *Azospirillum* только предстоит установить.

3.2 Исследование влияния условий культивирования на структуру экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245

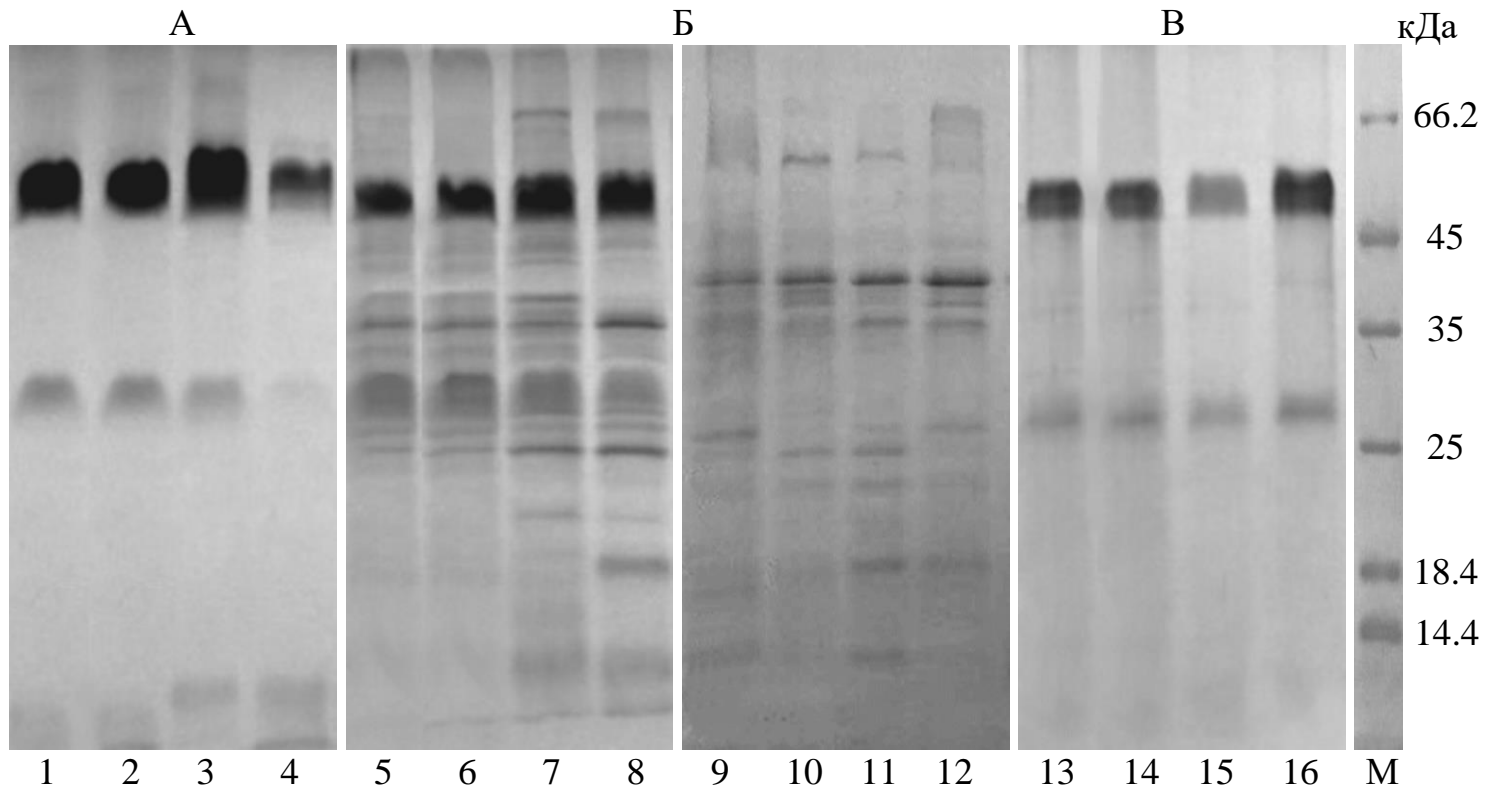
3.2.1 Влияние источника углерода в среде культивирования и фазы роста на структурные особенности КПС и ЛПС *A. baldaniorum* Sp245

В качестве источников углерода нами были выбраны малат натрия, наиболее часто используемый в питательных средах для выращивания бактерий рода *Azospirillum*, и фруктоза, которую используют в средах для повышенной флокуляции азоспирилл (Sadasivan and Neyra, 1985). Предварительное изучение динамики роста бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании как в среде с малатом натрия, так и в среде с фруктозой показало, что смена источника углерода не влияет на скорость роста бактерий данного штамма. На основании этого бактерии *A. baldaniorum* Sp245 выращивали в средах с малатом натрия или фруктозой на протяжении 24 ч, либо 120 ч, которые соответствовали окончанию экспоненциальной и стационарной фазам роста. Ранее для бактерий типового

штамма *A. brasilense* Sp7 и его спонтанного мутанта Sp7(S) было продемонстрировано возрастание рН по мере их роста в среде с малатом натрия с 6.8 до 8.5 к окончанию экспоненциальной фазы (Коннова и др., 2003). В отношении бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при выращивании в среде аналогичного состава обнаружили сходную тенденцию возрастания рН среды с изначального 6.8 до 8.0 к 24 ч культивирования, а также дальнейшее увеличение данного показателя до 9.4 к 120 ч. Обратный эффект выявили при использовании фруктозы в качестве источника углерода для штамма Sp245: рН среды с 6.8 снижалось до 4.5 к стационарной фазе роста. Подобное разнонаправленное изменение рН среды у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 обусловлено различиями в катаболизме органических кислот и моносахаридов данных бактерий (Martinez-Drets *et al.*, 1984).

С поверхности клеток *A. baldaniorum* Sp245 получили препараты КПС_{м24}, КПС_{м120}, КПС_{ф24}, КПС_{ф120} (м – среда с малатом натрия, ф – среда с фруктозой, 24 и 120 – продолжительность роста), фенольной экстракцией из сухой биомассы выделили соответствующие препараты ЛПС_{м24}, ЛПС_{м120}, ЛПС_{ф24}, ЛПС_{ф120}. Выходы КПС составили 3.5-5.0%, а ЛПС – 4.5-9.5% от массы высушенных бактериальных клеток. Образцы КПС_{м24} и ЛПС_{м24} мы использовали в качестве препаратов сравнения, поскольку они были исследованы ранее и для ОПС была установлена структура повторяющегося звена (Fedonenko *et al.*, 2002).

Результаты ДСН-ПААГ электрофореза образцов ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 продемонстрировали гетерогенность гликополимеров по молекулярной массе, а именно присутствие как S-форм с различной длиной полисахаридной цепи, так и R-форм молекул, не несущих ОПС (Рисунок 9А). Исследуемые препараты имели сходный характер миграции в геле и характеризовались доминированием S-ЛПС. В случае ЛПС_{ф120} R-форма была выражена крайне слабо, а в верхней части электрофореграммы появлялась дополнительная полоса, что указывает на увеличение степени полимеризации O-цепи (Рисунок 9А, трек 4). В работе, посвященной нетипичному характеру R-S диссоциации бактерий *A. brasilense* Sp7 было продемонстрировано, что при увеличении длительности культивирования до 72 ч происходит перераспределение вклада S- и R-антигенов, сопровождающееся преимущественным синтезом последнего и его экранирующим действием



1 – ЛПС_{М24}; 2 – ЛПС_{М120}; 3 – ЛПС_{Ф24}; 4 – ЛПС_{Ф120};

5, 9, 13 – КПС_{М24}; 6, 10, 14 – КПС_{М120}; 7, 11, 15 – КПС_{Ф24}; 8, 12, 16 – КПС_{Ф120};

1-8, 13-16 – окрашивание на углеводы; 9-12 – окрашивание на белки; М – белковые маркеры.

Рисунок 9 – Электрофореграмма ЛПС (А), необработанных (Б) и депротенизированных (В) КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в средах различного состава в течение 24 и 120 ч

по отношению к S-антигену (Матора и др., 2003). Отсутствие достаточно выраженной R-формы ЛПС у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой в течение 120 ч, вероятно, указывает на превалирование S-антигена вне зависимости от продолжительности роста и отклонение от схемы R-S диссоциации, выявленной при культивировании в среде с малатом натрия.

Наличие белковых составляющих в КПС определяло характер электрофоретической подвижности данных препаратов (Рисунок 9Б, треки 5-8). Обработка препаратов протеиназой К позволила выявить в КПС низко- и высокомолекулярные фракции с преобладанием последних по аналогии с электрофоретическими профилями ЛПС (Рисунок 9В). Визуализация белковых составляющих в препаратах КПС *A. baldaniorum* Sp245 продемонстрировала белковые полосы в диапазоне кажущихся молекулярных масс от 14 до 55 кДа с преобладанием полипептида с массой ~42 кДа (Рисунок 9Б, треки 9-12), очевидно соответствующего порину OтаА, который был описан выше (см. раздел 3.1.2).

Изменения условий культивирования оказывали влияние на белковый профиль КПС. В частности, в составе КПС_{м120} и КПС_{ф24} выявили белковую полосу с кажущейся массой ~55 кДа (Рисунок 9Б, треки 10 и 11). Препарат КПС_{ф120} характеризовался появлением новой полосы с массой ~40 кДа и отсутствием полипептида ~25 кДа (Рисунок 9Б, трек 12), который был обнаружен на электрофоретических профилях остальных образцов. Данный факт указывает на то, что источник углерода и фаза роста определяют состав и соотношение белков в КПС, которые задействованы в качестве адгезинов при первичном контакте бактерий с растениями при их колонизации.

Результаты определения углеводов, в том числе Kdo, фосфора и белков в препаратах ЛПС и КПС представлены в Таблице 10. В образцах ЛПС были обнаружены: 58-66% углеводов, 0.5-2.7% Kdo, 2.0-3.0% общего фосфора и незначительные примеси белков (~1%). Содержание Kdo в препаратах ЛПС увеличивалось как при росте в среде с малатом натрия до 120 ч, так и при росте в среде с фруктозой в течение 24 ч. Возрастание продолжительности выращивания данных бактерий в среде с фруктозой индуцировало снижение содержания Kdo по сравнению с препаратом ЛПС_{ф24}. Для ряда бактерий установлено, что определение Kdo колориметрическим методом может быть затруднено в виду ее экранирования

фосфатными группами (Holst, 2007). Вероятно, возрастание степени фосфорилирования молекул ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, которое наблюдалось в среде с фруктозой на стационарной фазе роста, обуславливает заниженное содержание Kdo.

Таблица 10 – Химический состав образцов ЛПС и КПС *A. baldaniorum* Sp245 при росте в средах с малатом натрия и фруктозой в течение 24 и 120 ч (содержание компонентов указано в % от массы сухого препарата)

Препарат	Белки	Углеводы	Kdo	Фосфор
ЛПС_{м24}	0.7±0.1	65.4±2.1	0.6±0.1	2.7±0.1
КПС_{м24}	22.1±0.2	24.8±1.2	1.1±0.1	1.2±0.1
ЛПС_{м120}	1.1±0.1	58.0±0.9	2.7±0.2	2.5±0.4
КПС_{м120}	26.0±0.3	25.5±1.0	0.5±0.1	0.9±0.1
ЛПС_{ф24}	0	60.2±1.1	1.3±0.1	1.9±0.5
КПС_{ф24}	10.5±0.1	39.2±2.4	0.5±0.1	0.7±0.1
ЛПС_{ф120}	0.7±0.1	66.0±4.8	0.7±0.1	3.1±0.2
КПС_{ф120}	21.6±0.1	40.0±2.4	0.5±0.1	2.3±0.7

Примечание. Доверительные интервалы определяли при 95% уровне значимости.

Препараты КПС характеризовались меньшим содержанием углеводов (25-40%), Kdo (за исключением КПС_{м24}) и остатков фосфорной кислоты в сравнении с образцами ЛПС. Поскольку КПС являются экстраклеточной формой ЛПС, которая образует комплекс с белковыми молекулами, в составе выделенных гликополимеров капсулы присутствовало значительное количество белка. Наименьшее содержание белковых компонентов (~10.5%) выявили в составе КПС_{ф24}, однако по результатам электрофореза существенных изменений в профиле данного гликополимера в сравнении с остальными препаратами не наблюдалось. Такой эффект, очевидно, связан с конформацией молекулы КПС_{ф24}, которая способствует повышенному мицеллообразованию, затрудняющему количественное определение белковых составляющих с помощью колориметрических методов. Была продемонстрирована зависимость доли углеводных составляющих в КПС от природы источника углерода в питательной среде. В частности, при культивировании в среде с фруктозой содержание углеводов в КПС *A. baldaniorum*

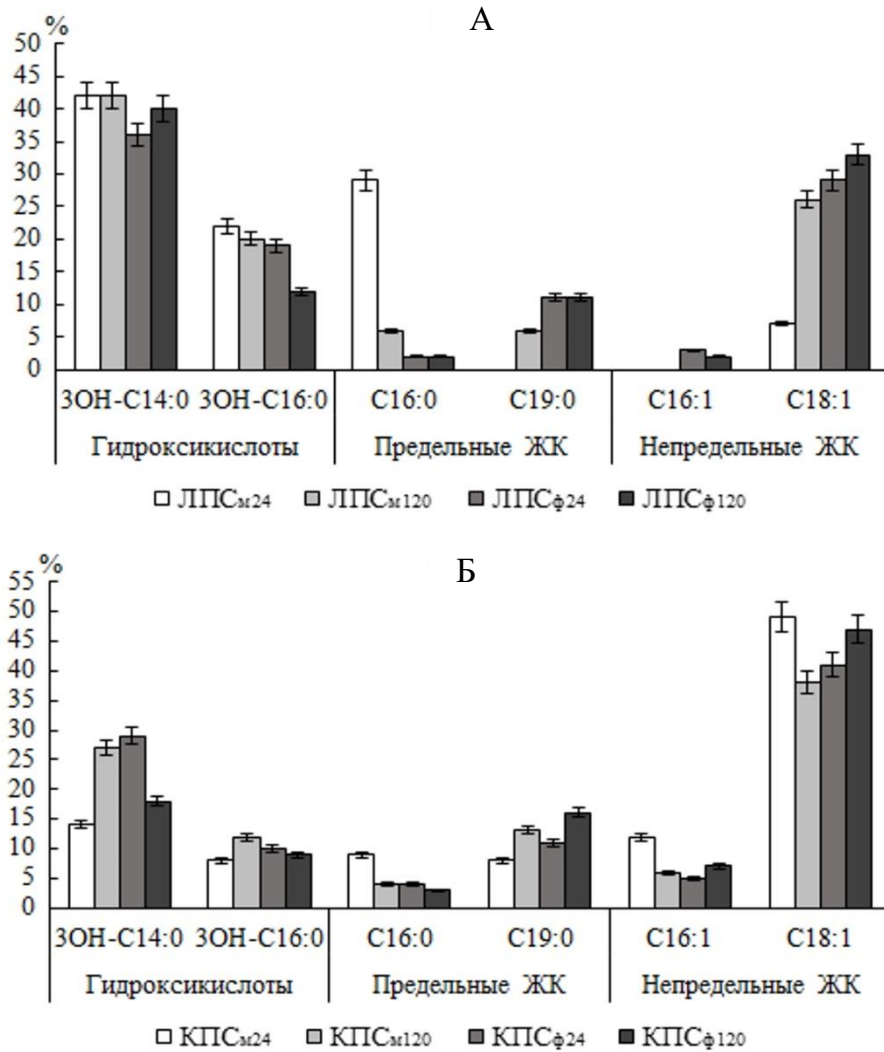
Sp245 превышало в полтора раза данный показатель для КПС при росте в среде с малатом натрия.

Количество остатков Kdo в КПС исследуемого штамма снижалось с увеличением возраста культуры в среде с малатом натрия и практически не изменялось при росте в среде с фруктозой. Продолжительное культивирование бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде с фруктозой приводило к возрастанию доли остатков фосфорной кислоты. Фосфатные группы влияют на субмолекулярную организацию молекул ЛПС в мембране и определяют совместно с составом и соотношением ЖК их эндотоксические, либо антагонистические свойства. Высокое содержание (до семи) фосфатных остатков в коре ЛПС *E. coli* повышает их конформационную гибкость по сравнению с молекулами ЛПС, содержащими две-три фосфатные группы (Rocque *et al.*, 1988). Таким образом, увеличение содержания общего фосфора в составе гликополимеров поверхности бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой в течение 120 ч, вероятно, свидетельствует об изменениях конформации ЛПС в мембране. Подобная реакция бактерий *A. baldaniorum* Sp245 на длительное культивирование в среде с альтернативным источником углерода может рассматриваться как один из механизмов адаптации при варьировании условий окружающей среды.

Липид А, как «якорная» составляющая молекул ЛПС, определяет биологическую активность данных гликанов. Установление состава ЖК гидрофобного домена КПС и ЛПС позволит охарактеризовать структурно-функциональные особенности гликополимеров поверхности азоспирилл, в том числе, при воздействии различных факторов среды. Образцы КПС и ЛПС содержали ЖК в диапазоне длин от C14 до C19. В ЛПС обнаружены 3ОН-C14:0, 3ОН-C16:0 и C18:1 ЖК, содержание которых составляло около 80% от суммы площадей выявленных пиков, а также кислоты C16:0, C16:1 (только при росте в среде с фруктозой) и C19:0, обнаруженные в меньших количествах (Рисунок 10А).

При увеличении времени культивирования бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде с малатом натрия в гидрофобных составляющих ЛПС возрастало содержание ненасыщенных ЖК, в наибольшей степени применительно к кислоте C18:1, и сокращалась доля насыщенной C16:0 ЖК. Культивирование данного штамма в среде с фруктозой сопровождалось увеличением количества C18:1 ЖК в ЛПС.

Можно заключить, что изменение рН среды, которое сопровождает рост азоспирилл в средах с малатом натрия и фруктозой, выступает для бактерий в качестве стрессора, адаптационной реакцией на который является увеличение содержания непредельных ЖК во внешней мембране.



Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Рисунок 10 – Состав ЖК ЛПС (А) и КПС (Б) бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в средах с малатом натрия и фруктозой на протяжении 24 и 120 ч (в % от суммы площадей пиков МЭЖК)

Переход на питательную среду с альтернативным источником углерода и увеличение продолжительности культивирования сопровождалось появлением кислоты C19:0 в составе ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (Рисунок 10А). Данный факт может объясняться тем, что на фоне увеличения содержания

непредельных ЖК в липидах *A* проявляются компенсаторные механизмы, связанные с синтезом предельных кислот с большей длиной углеродной цепи, которые направлены на прочное закоривание ЛПС в наружной мембране и поддержание ее целостности.

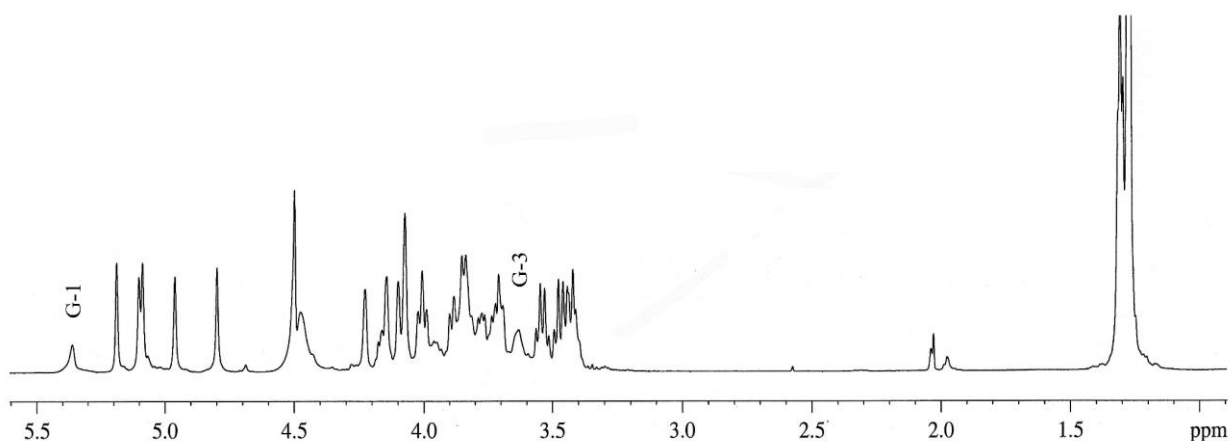
В образцах КПС выявили сходный с образцами ЛПС профиль ЖК, но с явным преобладанием непредельных (Рисунок 10Б). Выращивание бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде с малатом натрия на протяжении 120 ч сопровождалось снижением доли непредельных кислот, а именно C18:1 (с 48 до 36%), на фоне увеличения содержания 3-ОН-C14:0 ЖК (с 14 до 27%). В случае использования для культивирования азоспирилл среды с фруктозой наблюдали обратный эффект. В отличие от ЛПС *A. baldaniorum* Sp245, рост которых осуществляли в среде с малатом натрия, препараты КПС в аналогичных условиях содержали кислоту C16:1 (5-12.5%), а доля C19:0 ЖК в данных гликанах была в 1.5-2 раза выше. Несмотря на идентичность ОПС и ПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 стратегии изменения гидрофобных составляющих гликополимеров поверхности различаются при варьировании условий культивирования.

Далее мы изучали моносахаридный состав выделенных препаратов ЛПС и КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Целью данного анализа являлась оценка воздействия таких факторов как длительность культивирования и природа источника углерода на структуру полисахаридных фракций данных бактерий. Основным моносахаридным компонентом в составе анализируемых образцов ЛПС и КПС являлась D-Rha. Доля D-Rha об общего количества выявленных сахаров составляла 95-98%, причем продолжительность культивирования не оказывала существенного воздействия на содержание данного моносахарида. В том случае, если *A. baldaniorum* Sp245 выращивали в среде с фруктозой, то через сутки роста в составе ЛПС и КПС кроме D-Rha идентифицировали также D-Glc. Содержание данного моносахарида снижалась к пятым суткам выращивания бактерий с 38% до 4% в ЛПС и с 11% до 6% в КПС.

Из анализируемых препаратов КПС и ЛПС выделили полисахаридные компоненты. Исключение составили изученный ранее ЛПС_{М24} (Fedonenko *et al.*, 2002) и КПС_{М24}, структура углеводной составляющей которого определена в

настоящей работе (см. раздел 3.1.1). Использовали метод ЯМР-спектроскопии для определения структуры ОПС и ПС из препаратов ЛПС и КПС, соответственно.

При рассмотрении спектров ЯМР образцов ОПС_{ф24}, ОПС_{ф120}, ПС_{ф24}, ПС_{ф120} обнаружили сигналы, характерные для вышеназванных ПС. Также были выявлены дополнительные сигналы с различной интенсивностью у анализируемых препаратов, максимально выраженной в спектре ОПС_{ф24}. В аномерной области ¹H и ¹³C-ЯМР спектров ОПС_{ф24} помимо сигналов основной серии присутствовали сигналы меньшей интенсивности при 5.36 и 101.1 м.д., что указывало на присутствие дополнительного ПС, предположительно гомополимера, содержащего Glc, выявленную при моносахаридном анализе (Рисунок 11). Сигналы ¹H и ¹³C этого ПС были отнесены с использованием двумерных экспериментов ¹H/¹H COSY, TOCSY, ROESY и ¹H/¹³C HSQC (Таблица 11).



Арабские цифры соответствуют протонам в моносахаридных остатках: G, Glc.

Рисунок 11 – Спектр ¹H-ЯМР препарата ОПС_{ф24} бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Наличие корреляционных пиков от H-1 до H-6 в COSY и TOCSY спектрах, в сочетании со значениями $^3J_{H,H}$ КССВ протонов моносахаридных колец (Altona and Haasnoot, 1980) и химических сдвигов атомов углерода (Bock and Pedersen, 1983), свидетельствовало, что моносахариды в составе данного ПС имеют *глиуко* конфигурацию и находятся в пиранозной форме. Относительно сильнопольное положение сигнала C-1 при 101.1 м.д. и сигнала C-5 при 72.6 м.д., соответственно, указывало на то, что остатки Glc имеют α конфигурацию гликозидного центра. Смещение химического сдвига сигнала C-3 Glc в слабопольную область к 81.6 м.д.

по сравнению с его положением при 73.8 м.д. в незамещенном моносахариде (Bock and Pedersen, 1983), свидетельствовало о том, что Glc является 3-замещенной. Наличие H-1/H-3 кросс пиков при 5.36/3.63 м.д. в спектрах ROESY также указывало на замещение остатков Glc в положении 3. Следовательно, дополнительный ПС в составе ЛПС_{ф24} является глюканом, который состоит из остатков 3-замещенной α -D-Glcp.

Таблица 11 – Данные ¹H и ¹³C-спектров ЯМР ОПС_{ф24} *A. baldaniorum* Sp245 (δ , м.д.)

Моносахаридный остаток	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 (6a; 6b) C-6
$\rightarrow 3$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow	5.36 101.1	3.59 72.6	3.63 81.6	3.41 70.7	3.82 72.6	3.76; 3.86 61.9

Можно сделать вывод, что в результате культивирования бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде, содержащей фруктозу, изменяется моносахаридный состав ОПС. Помимо линейного D-рамнана в ОПС появляется дополнительный биополимер со следующей структурой мономера: $\rightarrow 3$)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow . На основании соотношения интегральных интенсивностей сигналов H-1 Glc и H-1 Rha¹ было установлено, что доля глюкана в ОПС_{ф24} достигала 25%, в ПС_{ф24} была на уровне 10%, а в ОПС_{ф120} и ПС_{ф120} составляла менее 5%.

Гомоглюканы могут выступать в роли запасного источника углерода, который перерабатывается азоспириллами в течение 120 ч культивирования. Такое предположение имеет под собой следующую предпосылку: глюканы обнаруживались в ЛПС и КПС штамма *A. baldaniorum* Sp245 только в первые сутки культивирования. Описанный в литературе факт наличия трофического таксиса бактерий *A. brasilense* SR55 к продуцируемым ими молекулам ЛПС может свидетельствовать в пользу данной гипотезы (Boyko *et al.*, 2011).

Моносахарид Glc может входить в состав КПС азоспирилл. Это, в частности, было продемонстрировано итальянской исследовательской группой (Del Gallo and Naegi, 1990). Авторы показали наличие Glc в КПС для двух штаммов азоспирилл – *A. brasilense* Cd и *A. lipoferum* Col5. Впрочем, стоит отметить, что в данной работе осуществляли культивирование бактерий в течение 72 ч, что может частично объяснять наблюдаемый эффект. Имеются и другие примеры. В работе Конновой с

соавт. (2003) при выращивании бактерий *A. brasilense* Sp7(S) использовали среду с глюконатом калия как источником углерода с продолжительностью роста пять суток. Оказалось, что при культивировании бактерий в таком варианте среды в капсуле обнаруживалась новая углеводная фракция. Данная углеводная составляющая КПС имела молекулярную массу 70 кДа, а содержание Glc составляло примерно 30% от доли остальных сахаров в данном гликане (Коннова и др., 2003). При этом функциональная значимость данных полимеров с Glc в составе по-прежнему не прояснена до конца. Есть предположение, что гомоглюкан формирует механические фибриллярные структуры. Подобные фибриллы могут быть важны для прочной адгезии бактерий рода *Azospirillum* при заселении корневой системы растений (Michiels *et al.*, 1991). В работе (Kannenberg and Carlson, 2001) проводили исследование симбионтов гороха *Rhizobium leguminosarum* 3841. В том случае, если данные бактерии культивировали в кислой среде с pH 5.0, то возрастало количество нейтральных моносахаридов в образцах ЛПС, в частности увеличивалось содержание Glc. Также в составе липида А ЛПС наблюдалось возрастание количества длинноцепочечных ЖК (Kannenberg and Carlson, 2001). Таким образом, изменения в составе и строении гликополимеров поверхности позволяют повысить эффективность адаптации ассоциативных и симбиотических ризобактерий к колонизации макропартнеров при повышенной кислотности среды.

Добавление в питательную среду вторичного метаболита растений фенольной природы – кверцетина – вызывает изменения в КПС бактерий *A. lipoferum* Sp59b, связанные с возрастанием доли Gal в их моносахаридном составе (Каневский и др., 2014). Синтез бактериями рода *Azospirillum* дополнительных глюканов/галактанов в КПС в ответ на варьирование условий среды указывает на определяющую роль капсулы в их приспособительных реакциях, направленных, в том числе, и на оптимизацию формирования растительно-микробных взаимодействий.

На основании полученных результатов можно заключить, что выращивание бактерий *A. brasilense* Sp245 в среде с малатом натрия в течение 120 ч индуцировало ряд защитных реакций со стороны капсульных и мембранных гликанов, необходимых для адаптации к защелачиванию среды по мере их роста. В

то же время, применение среды с фруктозой для выращивания данного штамма приводило помимо прочих к изменению структуры ОПС_{ф24} и ПС_{ф24}, выделенных из препаратов ЛПС_{ф24} и КПС_{ф24}, соответственно, и, в том числе, к продукции дополнительного полимера на основе D-Glc.

3.2.2 Структура и свойства ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в условиях температурного и солевого стрессов

Температурные границы роста бактерий рода *Azospirillum* позволяют отнести их к мезофилам. При интервале допустимых температур в пределах 4-45°C, оптимум роста азоспирилл наблюдается при 32-35°C, а фиксация азота атмосферы наиболее активно осуществляется при 33-40°C (Stephan *et al.*, 1981). Известно, что азоспириллы являются толерантными к концентрациям NaCl в диапазоне 200-300 мМ и сохраняют способность прикрепляться к корням растений и заселять их по альтернативному пути, который, как предполагают, вызван изменением структуры гликанов поверхности клеток (Fischer *et al.*, 2000; Rivarola *et al.*, 1998).

Первоначально нами были подобраны температура культивирования и концентрация NaCl в питательной среде, которые позволили бы получить необходимое количество биологического материала и оценить воздействие стрессового фактора на ПС поверхности бактерий. При температурном стрессе в качестве контрольного варианта бактерии *A. baldaniorum* Sp245 выращивали 24 ч в синтетической среде с малатом натрия при постоянном перемешивании на вибростенде при температуре 30°C, опытные варианты культивировали 24 ч в среде аналогичного состава в диапазоне температур 42-45°C с шагом в 1°C. При солевом стрессе бактерии исследуемого штамма выращивали при 30°C в питательной среде с содержанием 2 мМ NaCl в стандартном варианте и в средах с 200-350 мМ с шагом в 50 мМ в опытных.

Рост при температурах 43-45°C сопровождался сокращением количества жизнеспособных клеток на два порядка по сравнению с контрольным вариантом культуры. Использование среды с 200 мМ NaCl не влияло на выход биомассы

бактерий, при этом концентрации 300 и 350 мМ подавляли рост бактерий на два и четыре порядка, соответственно, в сравнении с контролем. В свою очередь, выращивание бактерий при 42°C и в среде, содержащей 250 мМ NaCl, приводило к снижению КОЕ/мл на один порядок, что создавало условия для накопления биомассы, достаточной для получения гликополимеров поверхности (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты определения КОЕ/мл бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в стандартных условиях и при температурном и солевом стрессах

Температура, °С	КОЕ/мл	Содержание, NaCl, мМ	КОЕ/мл
30	$(6.2 \pm 0.3) \times 10^6$	2	$(6.2 \pm 0.3) \times 10^6$
Температурный стресс		Солевой стресс	
42	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^5$	200	$(4.0 \pm 0.3) \times 10^6$
43	$(2.3 \pm 0.2) \times 10^4$	250	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^5$
44	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^4$	300	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^4$
45	$(1.1 \pm 0.2) \times 10^4$	350	$(0.5 \pm 0.2) \times 10^2$

Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Мониторинг роста культуры *A. baldaniorum* Sp245 при температуре 42°C, выявил сокращение длительности лаг-фазы до 2 ч, а также более ранний переход к стационарной фазе роста (12-14 ч), чем в стандартных условиях (18-20 ч) (Рисунок 12). Анализ динамики роста бактерий данного штамма обнаружил удлинение лаг-фазы до 10 часов при культивировании в среде с 250 мМ NaCl. Однако выход на стационарную фазу роста интактной и стрессированной культурами осуществлялся практически одновременно за счет сокращения логарифмической фазы при солевом стрессе до 8 часов (Рисунок 12).

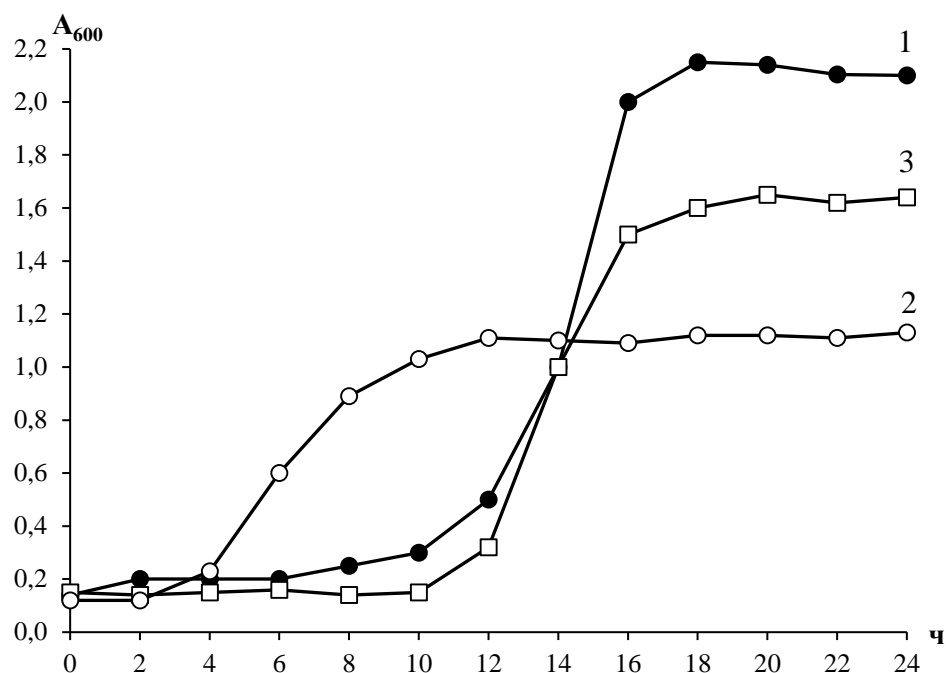


Рисунок 12 – Кривые роста бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в стандартных условиях (1), а также при температурном (42°C; 2) и солевом (250 мМ NaCl; 3) стрессах

Длительность лаг-фазы бактерий зависит от ряда параметров, включающих физиологическое состояние и количество инокулята при посеве, состав и рН питательной среды, температуру и т.д. Известно, что внесение посевного материала бактерий в среду аналогичного состава с увеличением исходной температуры культивирования приводит к сокращению лаг-фазы. Помимо этого, термофильные микроорганизмы характеризуются меньшей по сравнению с мезофильными представителями продолжительностью фазы интенсивного роста, которая может удлиняться при понижении температуры. Проведенные ранее исследования устойчивости типового штамма *A. brasilense* Sp7 и его Tn5-мутанта Car-1, характеризующегося гиперпродукцией каротиноидов, к повышению температуры (40°C) показали снижение интенсивности роста культур, сокращение длительности экспоненциальной и стационарной фаз, а также ранний переход (16 ч) к фазе отмирания (Mishra *et al.*, 2008). Таким образом, выявленные изменения в динамике роста *A. baldaniorum* Sp245 в условиях повышенных температур являются естественным механизмом защиты бактерий при воздействии данного вида стрессора.

Выращивание бактериальной культуры *A. baldaniorum* Sp245 при выбранном температурном режиме и повышенном содержании NaCl в среде сопровождалось агрегацией клеток, визуализируемой к 6-8 ч роста (Рисунок 13). Количественная оценка агрегации данного штамма азоспирилл как в опытных, так и в контрольных условиях показала, что наибольшая агрегационная способность клеток проявлялась при солевом стрессе и составляла 48%. В меньшей степени агрегирование клеток было выражено при температурном стрессе (26%) (Рисунок 14).

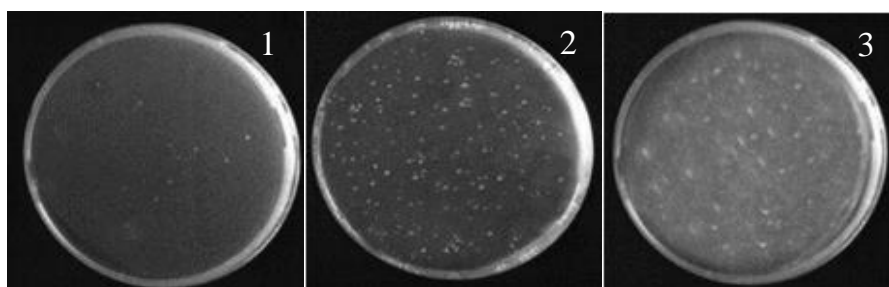
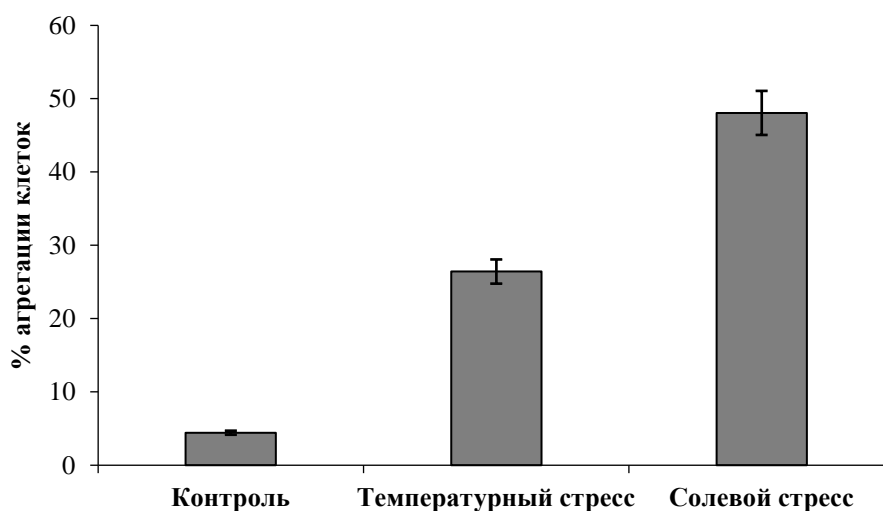


Рисунок 13 – Агрегация бактериальных культур *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в стандартных условиях (1), а также при температурном (42°C; 2) и солевом (250 mM NaCl; 3) стрессах



Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Рисунок 14 – Количественная оценка агрегации бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в стандартных и стрессовых условиях

Как было показано ранее, при различных стрессовых воздействиях у бактерий рода *Azospirillum* наблюдается формирование агрегатов и флокул,

которые помогают клеткам выживать и распространяться в динамичной почвенной среде. Флокулирующие культуры являются наиболее перспективными формами при инокуляции растений (Sadasivan and Neura, 1985; Bashan and Holguin, 1997). В формировании агрегатов задействованы экстраклеточные и капсульные гликополимеры (Michiels *et al.*, 1990; 1991; Katupitiya *et al.*, 1995), Fla и белки внешней мембраны (Burdman *et al.*, 1999; 2001), в том числе, лектины (Никитина и др., 2001). В связи с этим, подобная реакция азоспирилл на повышение температуры и увеличение содержания NaCl в среде свидетельствовала о модификациях в составе компонентов поверхности клеток, участвующих в процессе агрегации.

Индекс гидрофобности клетки показывает соотношение гидрофобных и гидрофильных молекул в составе внешней мембраны бактерий и является относительно постоянной величиной для конкретной микробиологической культуры. Определение данного индекса поможет охарактеризовать свойства поверхности бактерий и их взаимодействие с гидрофильными и гидрофобными поверхностями, а также указать на произошедшие изменения под воздействием каких-либо факторов среды (Никовская и др., 1989). С помощью теста солевой агрегации клеток штамма Sp245, выращенного в условиях температурного стресса, выявили снижение индекса гидрофобности клеток в два раза по сравнению с контрольным образцом. В случае солевого стресса наблюдалось увеличение данного показателя в полтора раза (Таблица 13).

Таблица 13 – Результаты определения относительной гидрофобности поверхности бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в стандартных и стрессовых условиях

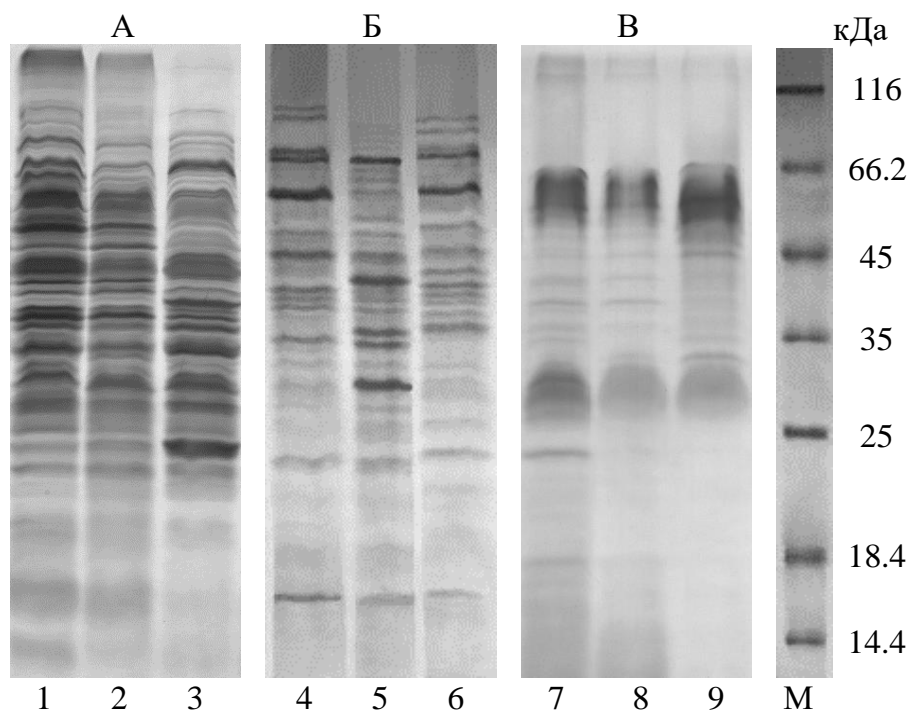
Условия культивирования	Индекс гидрофобности, %
Контроль	25.5±0.4
Температурный стресс	13.7±0.5
Солевой стресс	37.8±0.8

Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Для бактерий *A. brasilense* Sp7 ранее было показано, что возрастание концентрации белков внешней мембраны по мере старения культур приводит к увеличению гидрофобности клеток и, как следствие, повышает их адгезивные свойства (Dufrêne and Rouxhet, 1996). Неспецифические механизмы колонизации растений бактериями рода *Azospirillum*, в том числе, в почвенной среде, обусловлены зарядом и гидрофобностью бактерий (Michiels *et al.*, 1991). Не исключено, что температурный и солевой стрессы вызывают изменения в компонентном составе внешней мембраны *A. baldaniorum* Sp245, которые индуцируют агрегацию клеток, и, как следствие, повышают выживаемость бактерий и их адгезию к биотическим и абиотическим поверхностям.

Для выявления биополимеров поверхности бактерий *A. baldaniorum* Sp245, которые вовлечены в ответные реакции на температурный и солевой стрессы, ЭДТА-экстракцией были выделяли ЛПС и белки внешней мембраны из клеток, выращенных в стандартных и опытных условиях. ЭДТА-экстракты исследуемого штамма были представлены широким диапазоном молекул различных молекулярных масс. Профили ЭДТА-экстрактов азоспирилл, выращенных при стрессовых условиях, претерпевали изменения в количестве, либо интенсивности окрашивания отдельных полос по сравнению с контрольным образцом (Рисунок 15А).

Было обнаружено, что белковые профили ЭДТА-экстрактов контрольного и опытных вариантов бактериальных культур *A. baldaniorum* Sp245 различаются в количестве и интенсивности окрашивания отдельных полос (Рисунок 15Б). Профили ЭДТА-экстрактов из клеток, выращенных в стандартных условиях и при солевом стрессе, были сходны между собой, однако, в случае опытного образца отсутствовали полосы в диапазоне масс 105-110 кДа и были выявлены дополнительные полосы при 35 и 44 кДа. Культивирование бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при повышенной температуре привело, также, как и в случае солевого стресса, к исчезновению полосы в диапазоне кажущихся молекулярных масс 105-110 кДа, а также к снижению интенсивности окрашивания белковой полосы при 65 кДа. В то же время, в данном профиле, в отличие от контрольного образца, были обнаружены полипептиды с кажущимися молекулярными массами 30, 34 и 42 кДа.



1-3, 7-9 – окрашивание на углеводы; 4-6 – окрашивание на белки; М – белковые маркеры.

Рисунок 15 – Электрофореграммы ЭДТА-экстрактов (А и Б) и ЛПС (В) бактерий *A. baldaniorum* Sp245, культивируемых в стандартных условиях (1, 4, 7), при температурном (2, 5, 8) и солевом (3, 6, 9) стрессах

Обнаруженные изменения в составе белков внешней мембраны *A. baldaniorum* Sp245 при температурном и солевом стрессах, могут свидетельствовать о их важной роли в ответных реакциях бактерий на негативные воздействия со стороны окружающей среды.

ЛПС исследуемого штамма вне зависимости от условий культивирования имели сходный характер миграции в геле и содержали характерные для них S- и R-формы молекул (Рисунок 15В). В случае ЛПС бактерий штамма Sp245, выращенных при температурном и солевом стрессах, наблюдалось снижение гетерогенности образцов по молекулярной массе по сравнению с контрольным препаратом. В нижней части электрофоретического профиля ЛПС бактерий, выращенных в стандартных условиях, присутствовала полоса с кажущейся молекулярной массой ~23 кДа. В случае опытных вариантов ЛПС данная полоса отсутствовала (Рисунок 15В, треки 7-9). Полученные данные свидетельствуют о

схожих тенденциях изменения состава мембранного пула ЛПС для бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при температурном и солевом стрессах.

Поскольку проведенные эксперименты указывают на наличие модификаций в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в стрессовых условиях, нами были получены препараты ЭПС, КПС и ЛПС. В качестве препаратов сравнения использовали гликополимеры данного штамма, культивирование которого осуществляли в стандартных условиях. Продукция опытных образцов ЭПС и КПС в расчете на сухую биомассу клеток возрастала в среднем на 28 и 13% относительно контроля, в то время как выходы ЛПС, наоборот, снизились на 10-12%. Максимальная выработка внеклеточных гликанов данным штаммом наблюдалась при солевом стрессе. Такой результат коррелирует с данными количественной оценки агрегационной способности культур и, очевидно, связан с определяющей ролью ЭПС и КПС в образовании клеточных агрегатов.

Для симбиотических бактерий *Rhizobium* sp. (Cajanus) была показана схожая адаптационная реакция при температурном воздействии (Nandal *et al.*, 2005). Продукция ЭПС ризобиями дикого типа штамма PP201 и его термоустойчивыми мутантами была выше в стандартных условиях (30°C), чем при повышенной температуре (43°C). Однако, выработка ЭПС при стрессе у мутантов значительно превышала таковую для родительского штамма, что указывает на участие данных гликополимеров в защитных реакциях термоустойчивых ризобий. Возможно, подобная адаптация симбиотических и ассоциативных бактерий будет определять их конкурентоспособность при выживании в почве в случае изменения температурного режима.

Результаты сравнительного анализа химического состава контрольного и опытных препаратов ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 приведены в Таблице 14. Для экстраклеточных гликанов азоспирилл при культивировании в условиях температурного и солевого стрессов показано увеличение доли углеводов. Максимальное возрастание содержания углеводных компонентов, на 70% относительно контрольных образцов, наблюдали в ЭПС и КПС культуры при росте в среде с высокой концентрацией NaCl, обладавшей наибольшей агрегацией. В случае опытных препаратов ЛПС количество углеводов уменьшалось в

сравнении с контрольным образцом. Данный факт согласуется с рассмотренными ранее результатами электрофоретического разделения образцов ЛПС азоспирилл, выращенных в стандартных условиях и при стрессорах различной природы (Рисунок 15В). Для опытных препаратов экстраклеточных и мембранных гликополимеров выявили общую тенденцию увеличения содержания остатков фосфорной кислоты. Подобный эффект был максимально выражен в образцах ЭПС и КПС исследуемого штамма при солевом стрессе.

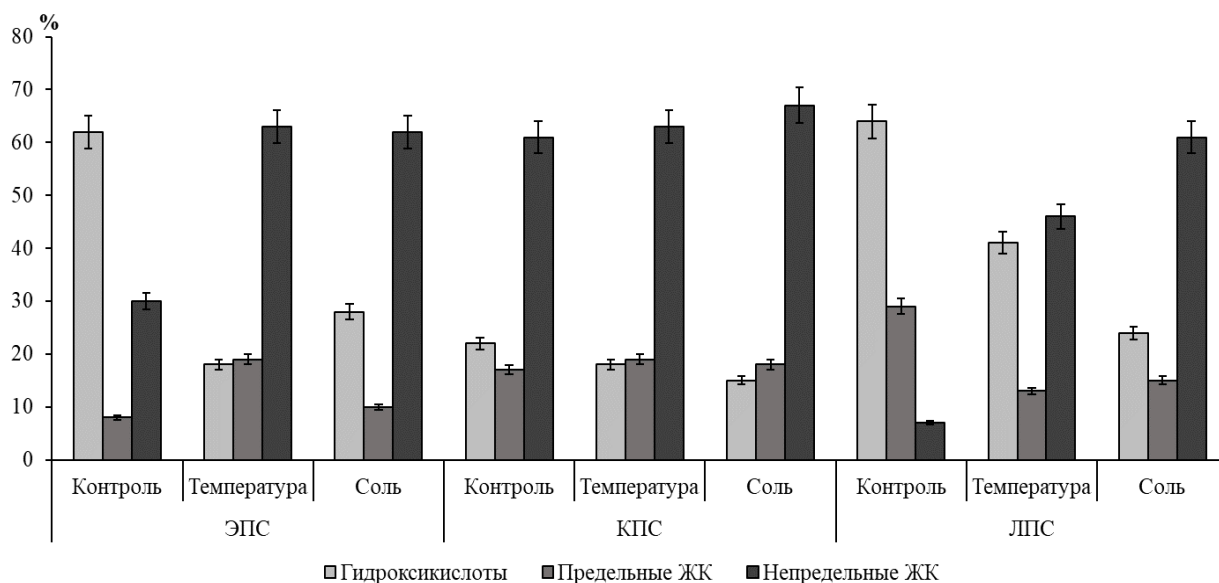
Таблица 14 – Химический состав препаратов ЭПС, КПС и ЛПС контрольной и стрессированных культур *A. baldaniorum* Sp245 (содержание компонентов указано в % от массы сухого препарата)

Компоненты	Стандартные условия	Температурный стресс	Солевой стресс
ЭПС			
Углеводы	25.6±1.7	36.8±2.5	44.5±2.7
Белки	1.7±0.1	1.5±0.1	1.3±0.2
Kdo	0.8±0.1	0.7±0.1	0.9±0.2
Фосфор	0.8±0.1	2.1±0.5	3.6±0.6
КПС			
Углеводы	24.8±1.2	37.2±2.3	43.5±2.3
Белки	22.1±0.2	21.4±1.0	23.7±1.3
Kdo	1.1±0.2	1.5±0.2	2.4±0.2
Фосфор	1.2±0.1	2.3±0.5	3.0±0.8
ЛПС			
Углеводы	65.4±2.1	45.2±2.8	60.2±3.4
Белки	0.7±0.1	0.5±0.1	1.0±0.2
Kdo	0.6±0.1	0.9±0.2	1.3±0.2
Фосфор	2.7±0.1	3.3±0.2	3.6±0.2

Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Полученные данные позволяют заметить, что изменения условий культивирования азоспирилл (смена источника углерода в питательной среде, увеличение продолжительности выращивания, повышенная температура и засоленность) вызывают сходные модификации биополимерного состава исследуемых гликанов.

Поскольку температура окружающей среды является ключевым фактором, определяющим фазовое состояние бактериальной мембраны, был проанализирован состав ЖК препаратов ЛПС и их экстраклеточных форм, полученных из клеток бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в стандартных условиях и при воздействии стрессов (Рисунок 16). Липидные фракции ЭПС, КПС и ЛПС характеризовались сходным жирнокислотным составом, однако соотношение мажорных ЖК изменялось при варьировании условий культивирования.



Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Рисунок 16 – Состав ЖК препаратов ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в стандартных и стрессовых условиях (в % от суммы площадей выявленных пиков МЭЖК)

В опытных образцах ЭПС наблюдалось возрастание доли непредельных и предельных ЖК в среднем в 2 раза и снижение содержания 3-гидроксилированных кислот приблизительно в 3 раза по сравнению с контрольным препаратом. Помимо этого, ЭПС исследуемого штамма, рост которого осуществляли при 42°C, содержали кислоты C16:1 и C19:0, не выявленные в качестве компонентов стандартного образца ЭПС. Для капсульных гликополимеров штамма Sp245 существенных изменений в составе ЖК при стрессовых воздействиях обнаружить не удалось. Также как в случае экстраклеточных гликанов в составе опытных препаратов ЛПС возростала доля непредельных ЖК, причем максимальное

увеличение (в 6.5 раз) было зафиксировано в ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных при солевом стрессе. Кроме того, опытные образцы ЛПС отличались снижением содержания предельных кислот в среднем в 2 раза. Выявленные тенденции изменения соотношения превалирующих ЖК в препаратах ЭПС и ЛПС при повышении температуры и росте в среде с 250 мМ NaCl указывают на важную функцию данных гликанов при адаптации бактерий к подобным стрессорам. Тем не менее разнонаправленный характер подобных модификаций свидетельствует о различном вкладе экстраклеточных и мембранных гликополимеров в стрессовый ответ.

Адаптивная функция гидрофобного домена гликополимеров поверхности клеток бактерий при колебаниях температуры окружающей среды проявляется не только у представителей почвенной микрофлоры. Повышение температуры культивирования оппортунистических гамма-протеобактерий *Aeromonas hydrophila* сопровождалось возрастанием соотношения предельных ЖК к непредельным в липидах А молекул ЛПС приблизительно в полтора раза (Merino *et al.*, 1992), а в случае другого представителя класса гамма-протеобактерий *Proteus mirabilis* температурное воздействие приводило к снижению данного соотношения в два раза (Rottem *et al.*, 1978). Применительно к мутантному штамму *E. coli*, дефектному по одному из ферментов биосинтеза липида А ЛПС – лауроилтрансферазе (LpxL), было показано включение в структуру липида А вторичных ЖК с большей длиной углеродной цепи (C16:0 и C16:1) в условиях повышения температуры до 37 и 42°C (Schilling *et al.*, 2014). Синтез непредельных ЖК, в частности кислоты C16:1, в ЛПС также наблюдался при воздействии пониженных температур на ряд штаммов энтеробактерий *Salmonella minnesota* и *S. typhimurium*, а также *P. mirabilis* (Wollenweber *et al.*, 1983; Seydel *et al.*, 1984). Имеющиеся данные о модификациях липидов А ЛПС грамотрицательных бактерий при выращивании в условиях температурного стресса свидетельствуют о наличии различных адаптационных стратегий, которые зависят от занимаемой микроорганизмами экологической ниши.

Для выявления влияния температурного и солевого стрессов на структуру углеводных компонентов препаратов ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 определяли их моносахаридный состав (Рисунок 17). В препарате ЭПС

данного штамма, выращенного при 42°C, наблюдали увеличение содержания Glc на 8% относительно контроля. ЭПС бактерий, рост которых осуществляли в условиях засоленности, не имел существенных отличий от контрольного ЭПС, за исключением небольшого увеличения содержания Fuc.

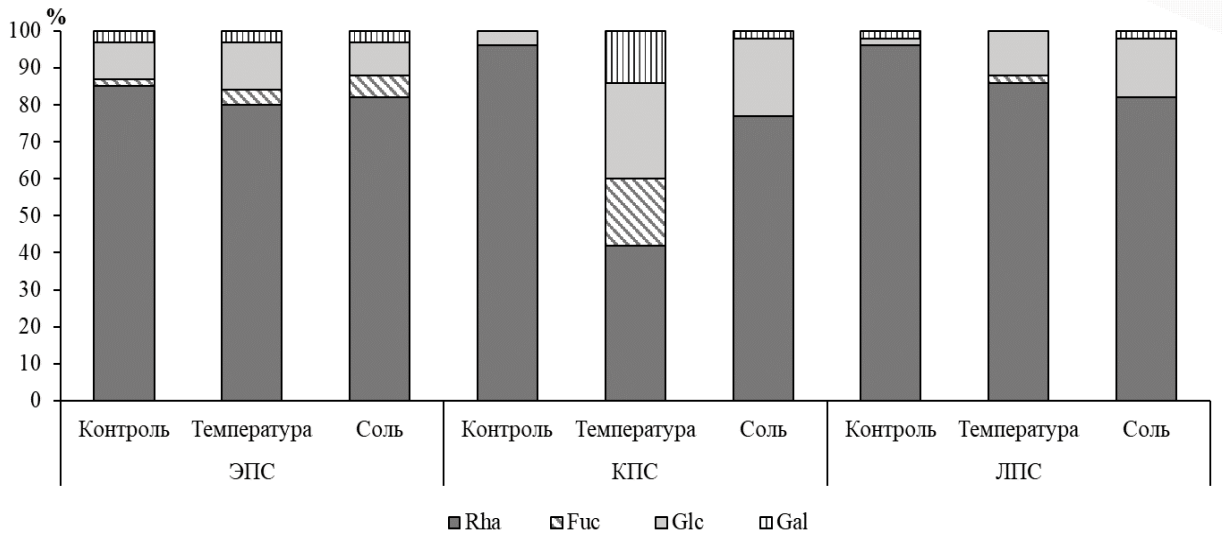


Рисунок 17 – Моносахаридный состав образцов ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в стандартных и стрессовых условиях (в % от суммы площадей выявленных пиков ацетатов полиолов)

При температурном стрессе в КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 выявили возрастание доли Glc на 25% по сравнению с контролем, а также появление остатков Fuc (18%) и Gal (14%). При культивировании азоспирилл в среде с 250 мМ NaCl в КПС также наблюдали увеличение содержания Glc на 20%. В опытных образцах ЛПС обнаружили сходную с образцами ЭПС и КПС тенденцию накопления Glc: в случае температурного воздействия содержание данного моносахарида увеличилось на 12%, а при солевом стрессе – на 15%.

Поскольку флокулирующие культуры азоспирилл являются наиболее перспективным вариантом для применения в составе микробных биопрепаратов, ранее группой израильских ученых были проведены исследования структурных особенностей углеводных компонентов поверхности клеточных агрегатов и флокул. В результате было выявлено, что выращивание бактерий *A. brasilense* Sp7 и Cd в средах с разными соотношениями C : N сопровождалось возрастанием

содержания арабинозы в моносахаридном составе ЭПС и КПС (Burdman *et al.*, 2000b). Было установлено, что степень агрегации и флокуляции *A. brasilense* зависит от количества арабинозы, присутствующей в ЭПС (Bahat-Samet *et al.*, 2004). Однако, в результате проведенного нами исследования была показана корреляция между агрегационной способностью данного штамма азоспирилл и возрастанием доли Glc в ЭПС и КПС.

Таким образом, нами установлено, что у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при температурном и солевом стрессах увеличивается агрегация клеток, в том числе, за счет возрастания продукции экстраклеточных гликополимеров, а также происходит накопление Glc в составе ЭПС, КПС и ЛПС. Хотя тенденция увеличения содержания Glc проявлялась как при повышении температуры, так и при возрастании концентрации NaCl в среде, данный эффект у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 был выражен в разной степени.

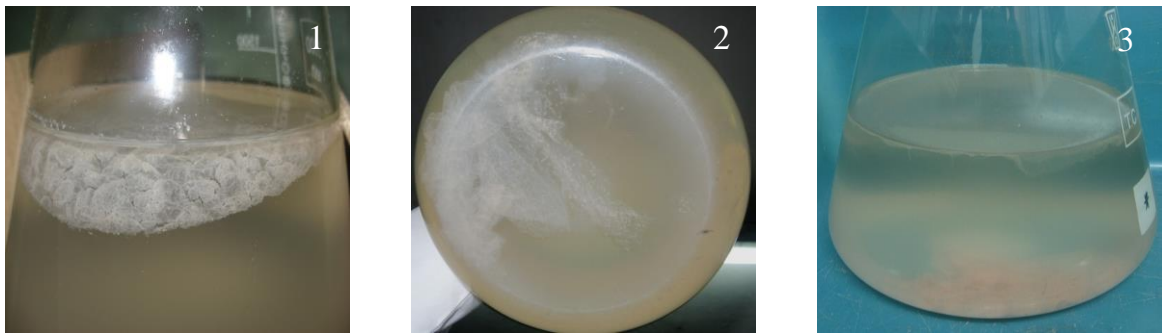
3.3 Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4

3.3.1 Характеристика биопленок и состава углеводных компонентов матрикса и поверхности клеток бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Поверхность раздела «воздух-жидкость» является благоприятной нишей для роста бактериальных клеток, вследствие постоянного доступа кислорода воздуха на фоне достаточного количества питательных веществ, присутствующих в жидкой среде (Armitano *et al.*, 2014). Ранее было показано, что ризобактерии *A. brasilense* Sp7 способны образовывать биопленки на границе фаз «воздух-жидкость», а адаптационный механизм для защиты нитрогеназной системы от ингибирующего действия кислорода включает увеличение продукции экстраклеточных гликополимеров и формирование цист-подобных структур (Wang *et al.*, 2017).

Способность бактерий *A. baldaniorum* Sp245 к образованию в стационарных условиях биопленок анализировали при культивировании в питательной среде с

малатом натрия при температуре 30°C. К 120 ч роста на поверхности раздела фаз «воздух-жидкость» формировались хорошо выраженные биопленки (Рисунок 18). Увеличение продолжительности выращивания, либо механическое воздействие приводили к оседанию биопленок под собственной тяжестью и формированию новых на границе раздела фаз «воздух-жидкость». В используемых условиях также наблюдали рост планктонной культуры бактерий *A. baldaniorum* Sp245, однако, его интенсивность заметно уступала таковой при постоянном перемешивании и аэрации. Данные результаты продемонстрировали, что исследуемый штамм способен образовывать биопленки при стационарном культивировании с менее выраженным ростом планктонных форм.



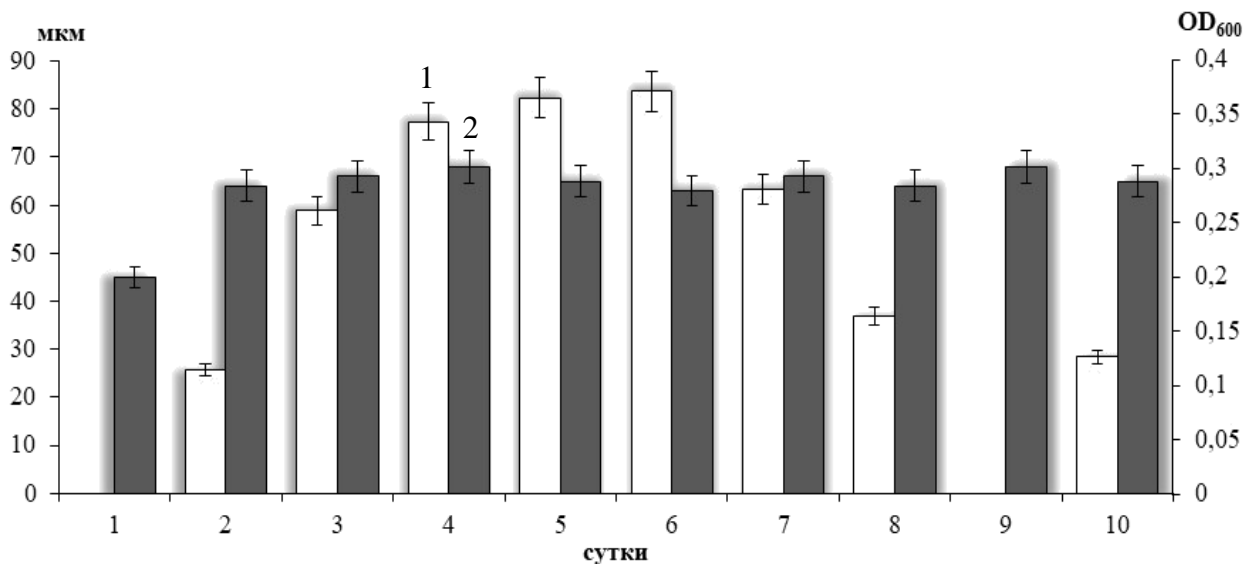
1 – зрелая биопленка, 2 – осевшая биопленка после механического воздействия,
3 – повторное образование биопленки.

Рисунок 18 – Биопленки бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Оценка динамики роста биопленок и планктонной культуры бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при стационарном культивировании (Рисунок 19) продемонстрировала, что достижение максимальной толщины биопленок – «зрелой формы» (82.4 ± 7.4 мкм) – наблюдалось к пятым-шестым суткам выращивания. На седьмые сутки роста было зафиксировано начало дисперсии биопленок, сопровождающееся образованием новой биопленки на поверхности раздела фаз «воздух-жидкость». Оптическая плотность планктонной культуры при этом оставалась приблизительно на одном уровне на протяжении всего периода мониторинга.

Известно, что ВПМ чрезвычайно важен для жизнедеятельности биопленок, а именно поддержания трехмерной архитектуры, адгезии к различным

поверхностям, роли защитного барьера и источника питательных элементов и т.д. (Flemming and Wingender, 2010). Для визуализации компонентов ВПМ в нативных биопленках бактерий *A. baldaniorum* Sp245 применяли конфокальную микроскопию. Были использованы родоспецифические антитела к основным белкам поверхности бактериальных клеток и поликлональные антитела к ЛПС гомологичного штамма, меченных флуоресцентным красителем ТРИТЦ. В результате было обнаружено, что антитела к белкам внешней мембраны, связывались не только с клетками, но и взаимодействовали с компонентами ВПМ, формируя ореол свечения флуоресцентного красителя по границам фрагмента нативной биопленки (Рисунок 20Б).

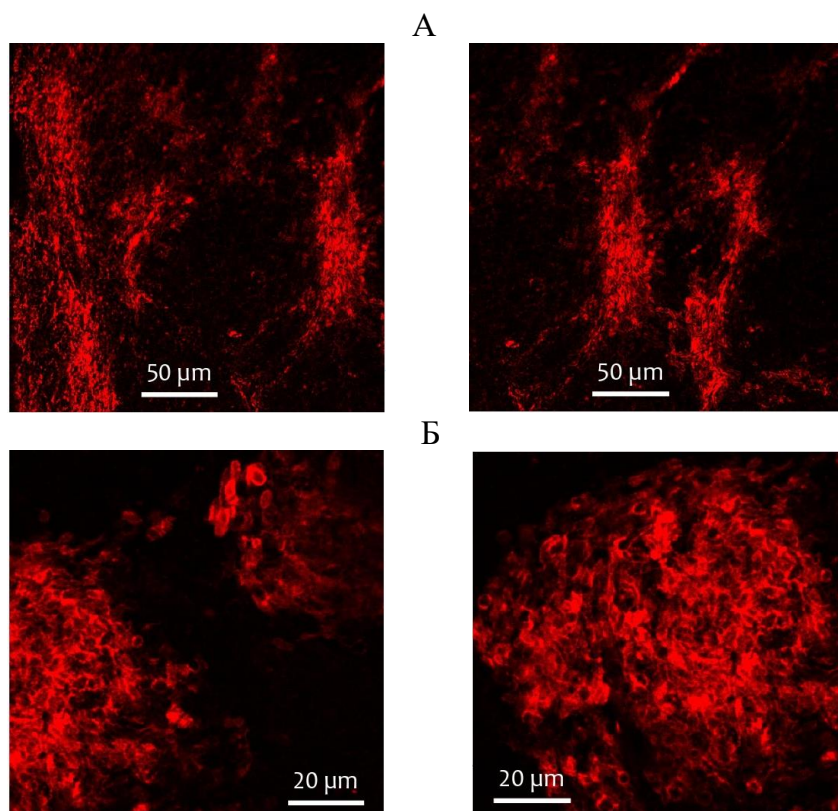


1 – толщина биопленки, 2 – оптическая плотность планктонной культуры.

Рисунок 19 – Динамика роста биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245

В случае использования антител к ЛПС окрашенные с помощью ТРИТЦ участки приходились на скопления клеток и отдельные компоненты матрикса. При этом гликополимеры, с которыми связывались антитела к ЛПС, были распространены в матриксе неравномерно, образуя подобие «тяжей», которые пронизывали биопленку и формировали фибриллярную структуру (Рисунок 20А). Полученные результаты указывают на преобладание в составе ВПМ белковых молекул, которые равномерно распределены по площади биопленок исследуемого штамма. Также во ВПМ присутствуют экстраклеточные формы ЛПС, особенности

локализации которых свидетельствуют о структурообразующей роли подобных гликанов при формировании и функционировании биопленок.



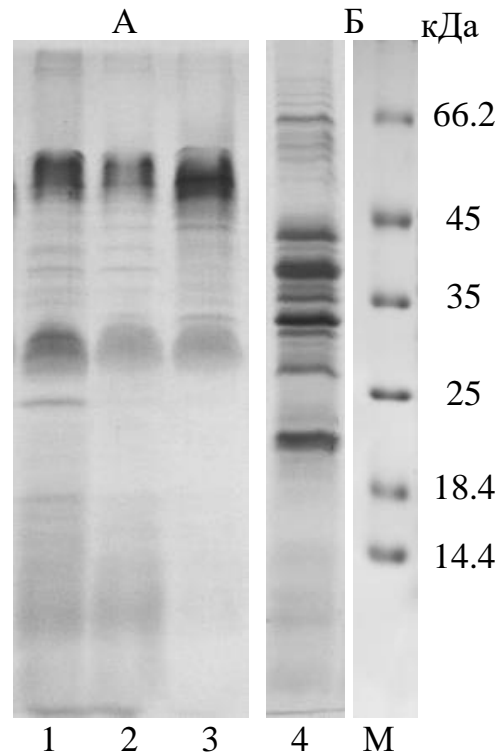
А – визуализация с использованием поликлональных антител к ЛПС *A. baldaniorum* Sp245, меченных флуоресцентным красителем ТРИТЦ, Б – визуализация с использованием родоспецифических антител к основным белкам поверхности *A. baldaniorum* Sp245, меченных ТРИТЦ.

Рисунок 20 – Результаты конфокальной микроскопии нативных биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Из пятисуточных биопленок выделили ВПМ, выход которого составил 12.7% от массы сухих клеток. Из внешней мембраны клеток биопленок проэкстрагировали ЛПС, обозначенный нами как ЛПС_Б. Выход образца ЛПС_Б достигал 6.7% от массы высушенной клеточной биомассы.

По данным ДСН-ПААГ электрофореза (Рисунок 21) в составе ВПМ были обнаружены углеводные и белковые компоненты в широком диапазоне молекулярных масс. После обработки ВПМ протеиназой К электрофоретический профиль препарата стал идентичен профилю ЛПС_Б и характеризовался присутствием S-форм ЛПС с различной длиной полисахаридной цепи и R-форм.

Для планктонных культур азоспирилл способность к продукции внеклеточной формы ЛПС в виде ЛПБК в составе капсулы была показана ранее (Konnova *et al.*, 1994) и в настоящей работе (разд. 3.1.1), однако, в составе ВПМ экстраклеточная форма ЛПС азоспирилл была выявлена нами впервые. Ранее ЛПС в качестве компонента ВПМ были обнаружены в случае грамотрицательных оппортунистических бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Coulon *et al.*, 2010).



А – окрашивание на углеводы, Б – окрашивание на белки, М – белковые маркеры.

Рисунок 21 – Электрофореграммы нативного (Б) и депротеинизированного (3) образца ВПМ, а также ЛПС биопленок (2) и планктонной культуры (1) бактерий

A. baldaniorum Sp245

Содержание белка в выделенном образце ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 по результатам колориметрических методов составляла не менее 70%. Выделенные из ВПМ в ходе протеиназной обработки гликополимеры содержали характеристические для ЛПС компоненты – углеводы, 3-гидроксилированные ЖК, остатки Kdo и фосфорной кислоты. На основании результатов конфокальной микроскопии, электрофоретического разделения и анализа химического состава углеводную фракцию ВПМ обозначили как ЛПС_М. В

препаратах ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок бактерий исследуемого штамма содержание углеводов, в том числе остатков Kdo, достигало в среднем 65.5% и остатков фосфорной кислоты – ~1.5%.

При анализе состава гидрофобных компонентов (Таблица 15) в ЛПС_Б было выявлено преобладание 3-гидроксикислот, содержание которых достигало 64% от суммы идентифицированных ЖК. В ЛПС_М содержание этих кислот составляло приблизительно 15% от суммы обнаруженных ЖК, а доминирующей (65%) являлась непредельная октадеценовая кислота (C18:1). Известно, что липиды и биосурфактанты в составе ВПМ играют важную роль при развитии биопленок, влияя на поверхностное натяжение на границе «воздух-жидкость» (Flemming and Wingender, 2010). Высокое содержание непредельных ЖК может придавать архитектуре биопленки необходимую «текучесть».

Таблица 15 – Состав ЖК препаратов ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Препарат	Содержание МЭЖК, % от суммы площадей пиков				
	3-ОН 14:0	16:0	3-ОН 16:0	18:1	19:0
ЛПС _М	9.7±0.3	12.3±0.3	6.2±0.1	64.1±4.1	7.7±0.1
ЛПС _Б	39.1±2.4	7.5±0.1	24.9±1.2	24.3±2.7	4.2±0.1

Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Определение моносахаридного состава препаратов ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок *A. baldaniorum* Sp245 продемонстрировало преобладание D-Rha, что ранее отмечалось для ЛПС планктонной культуры, выращенной в стандартных условиях (Fedonenko *et al.*, 2002) и согласовывалось с перекрестными реакциями с антителами к данному ЛПС.

Таким образом, впервые были установлены особенности образования биопленок бактериями штамма *A. baldaniorum* Sp245, определен состав их ВПМ и охарактеризованы гликополимеры поверхности клеток и ВПМ.

3.3.2 Структура гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий *A. halopraeferens* Au4

Растения при формировании ассоциаций с азоспирилами нередко приобретают устойчивость к различным стрессовым воздействиям, в частности, к засолению почв, что позволяет использовать подобные растительно-бактериальные системы для восстановления плодородия таких почв (Alamri and Mostafa, 2009; Khalid *et al.*, 2017). При этом предпочтение при выборе микросимбионта в подобной системе должно отдаваться галотолерантным бактериям. Бактерии *A. halopraeferens* Au4 (Reinhold *et al.*, 1987) были выделены в Пакистане из ризопланы злака *Leptochloa fusca* L. Kunth, широко используемого для ремедиации почв. Данный штамм является галотолерантным и имеет оптимум роста в диапазоне температур 40-42°C. В связи с этим важным представляется изучение особенностей биопленкообразования перспективными в биотехнологическом плане бактериями *A. halopraeferens* Au4.

Галотолерантные бактерии *A. halopraeferens* Au4, также как и бактерии *A. baldaniorum* Sp245, образовывали биопленки в стационарных условиях (Рисунок 22). Динамика роста планктонной и биопленочной форм двух штаммов была схожа, однако максимальная толщина зрелых биопленок штамма Au4 составляла 67.5 ± 5.1 мкм.

Из пятисуточной биомассы биопленок *A. halopraeferens* Au4 получили образцы ВПМ и ЛПС_Б, выходы которых составили 13.1 и 5.6%, соответственно, от массы высушенных клеток. Результаты анализа электрофоретической подвижности препаратов ВПМ выявили белковые полосы в широком диапазоне кажущихся молекулярных масс по аналогии с ВПМ биопленок штамма Sp245. Химический анализ ЛПС_Б и выделенных из матрикса ЛПС_М выявил наличие близких по содержанию углеводов (~60%), остатков Kdo (3.6%) и фосфорной кислоты (~5%). Состав и соотношение ЖК препаратов ЛПС_Б и ЛПС_М не имели существенных различий в сравнении с соответствующими образцами ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245.

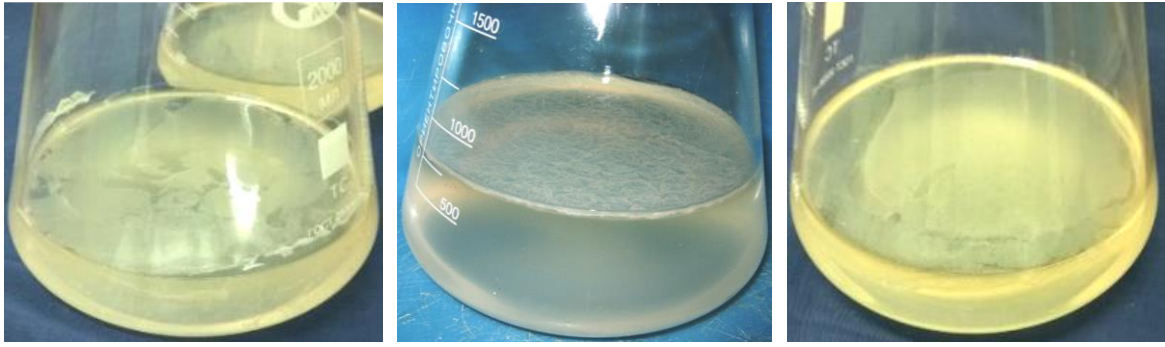


Рисунок 22 – Биопленки бактерий *A. halopraeferens* Au4

В моносахаридном составе ЛПС_М и ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 присутствовали Rha, Fuc, ксилоза (Xyl), Glc, а также 2-*O*-метилрамноза (Rha2OMe). Сходный состав был установлен для ОПС *A. halopraeferens* Au4 (Sigida *et al.*, 2016), однако, содержание Glc в ЛПС_М и ЛПС_Б было в 1.5-2 раза выше.

Из препарата ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 были выделены две полисахаридные фракции ОПС_I и ОПС_{II}, которые в дальнейшем исследовали методом ЯМР спектроскопии.

¹³C-ЯМР спектр ОПС_I показал гетерогенность образца и включал две серии сигналов разной интенсивности, что указывало на нерегулярность его структуры. В области аномеров присутствовали сигналы двух атомов углерода при 101.3 и 101.5 м.д., спектр также содержал сигналы двух СН₂-ОН групп при 62.3 и 62.4 м.д. и сигналы восьми атомов углерода в диапазоне 71.2-79.2 м.д. Отсутствие сигналов в области 84-88 м.д., характеристичных для фуранозидов (Bock and Pedersen, 1983), указывало на пиранозную форму всех моносахаридных остатков. Соответственно, в спектре ¹H-ЯМР ОПС_I присутствовали сигналы аномерных протонов при 5.40 м.д. и сигналы других протонов моносахаридного кольца в области 3.43-3.98 м.д.

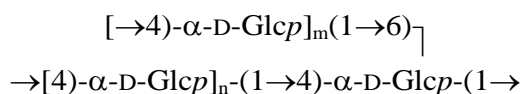
Сигналы ¹H и ¹³C ЯМР спектров ОПС_I были отнесены с использованием двумерных экспериментов ЯМР: ¹H, ¹³C HSQC, ¹H,¹H COSY и ¹H,¹H ROESY (Таблица 16). Две спин-спиновые системы моносахаридов **A** и **Б**, имеющих *глюко* конфигурацию, были идентифицированы путем выявления корреляций от H-1 до H-6 в COSY спектрах, учитывая значения характеристических констант спин-спинового взаимодействия. Относительно сильнополюное положение сигналов C-1 при 101.3 и 101.5 м.д., соответственно, свидетельствовало об α -конфигурации гликозидного центра остатков Glc. Значения химических сдвигов C-2–C-6 остатка

Б указывали на его терминальную позицию, тогда как смещение сигнала С-4 остатка А в слабopольную область к 79.1 м.д., по сравнению с его положением в незамещенном моносахариде при 70.6 м.д. (Bock and Pedersen, 1983), подтверждает его замещение в положение 4, что подкрепляется корреляцией А Н-1/Н-4 при 5.40/3.98 м.д. в спектрах $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY. Таким образом, с учетом интенсивности сигналов в ^{13}C -ЯМР спектре, было установлено, что основная цепь ОПС_I состоит из остатков 4-замещенной $\alpha\text{-D-Glcp}$, а боковыми заместителями являются остатки терминальной $\alpha\text{-D-Glcp}$, нестехиометрически расположенные вдоль полимерной цепи, при этом позиции их присоединения оставались не выявленными. Для решения этой задачи ОПС_I был проанализирован методом метилирования, который выявил, что, помимо остатков 4-замещенной и терминальной Glc, в препарате в меньшем количестве присутствуют остатки 4,6-дизамещенной Glc.

Таблица 16 – Данные ^{13}C и ^1H -спектров ЯМР глюкана, выделенного из ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 (δ , м.д.)

Моносахаридный остаток	Н-1 С-1	Н-2 С-2	Н-3 С-3	Н-4 С-4	Н-5 С-5	Н-6 (6а; 6b) С-6
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1 \rightarrow$	5.40 101.3	3.65 73.2	3.63 74.9	3.98 79.2	3.85 73.0	3.79; 3.86 62.3
$\alpha\text{-D-Glcp}\text{-}(1 \rightarrow$	5.40 101.5	3.60 73.5	3.70 74.7	3.43 71.2	3.75 74.4	3.79; 3.86 62.4

Таким образом, терминальная Glc гликозилирует основную цепь в положении 6. Отсутствие сигналов 4,6-дизамещенной Glc в спектрах ЯМР ОПС_I свидетельствует о высокой степени гетерогенности исследуемого полимера и об отсутствии регулярности его разветвления терминальным заместителем (моносахаридом либо терминальной полисахаридной цепью). Таким образом, ОПС_I близок по структуре к крахмалу, а схематически его строение можно представить следующим образом:

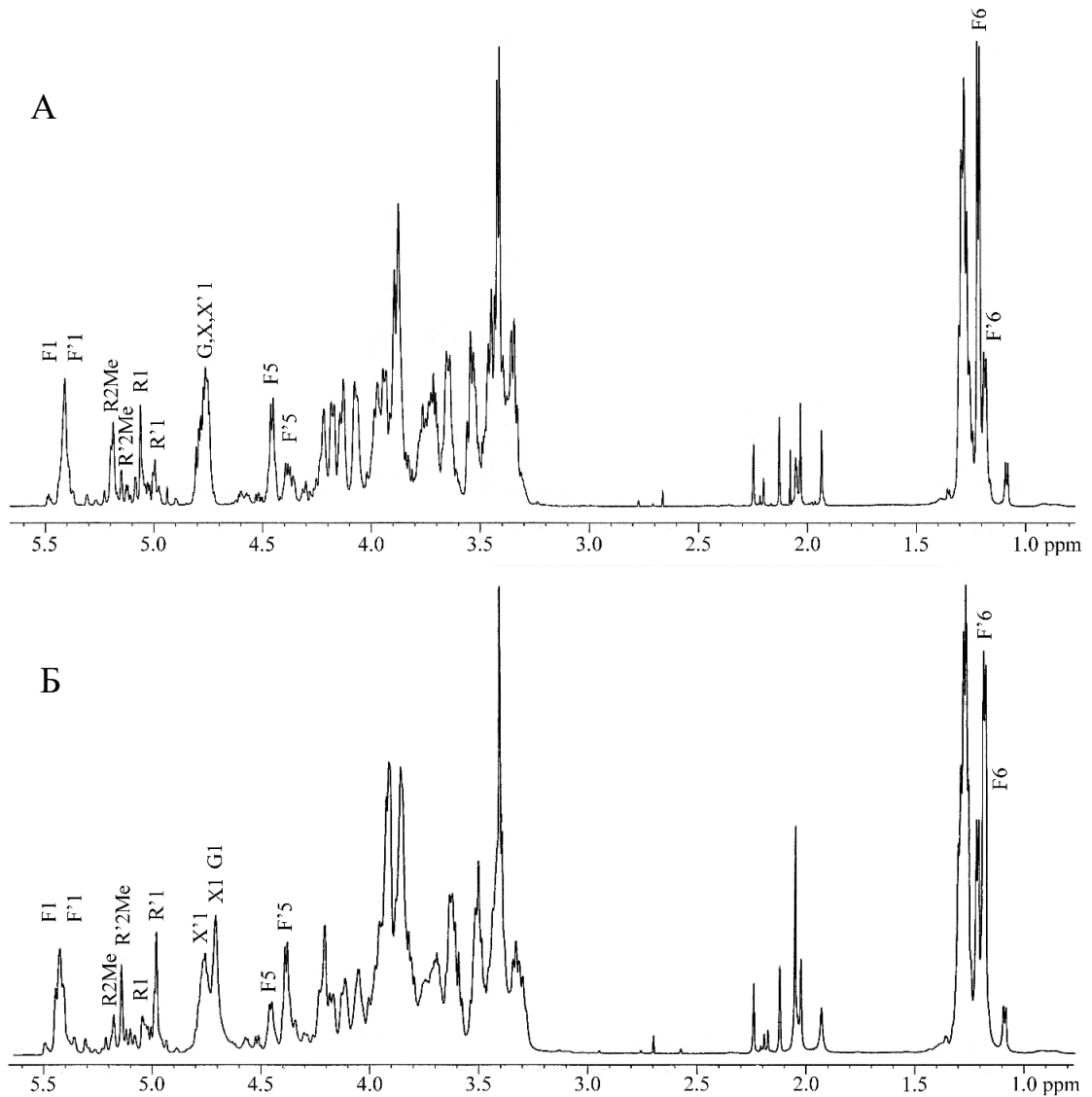


В спектре ^1H -ЯМР ОПС_{II} также присутствовали сигналы разной интенсивности: несколько сигналов аномерных протонов при 4.76-5.44 м.д., сигнал

ОМе группы при 3.43 м.д., группа сигналов СН₃-групп (H-6 Fuc и Rha) при 1.18-1.30 м.д. и других протонов моносахаридного кольца при 3.43-3.98 м.д. ОПС планктонной культуры, структура которого была установлена ранее (Sigida *et al.*, 2016) имел сходный спектр ¹H-ЯМР (Рисунок 23), что свидетельствовало о близости их строения.

В спектре ¹H-ЯМР ОПС_{II} присутствовали сигналы моносахаридов всех 4 типов повторяющихся звеньев, установленных ранее в составе ОПС (Рисунок 23), однако, их соотношение было иным. На основании отношения интенсивности аномерных протонов было установлено, что степень глюкозилирования ОПС_{II} составляла ~25%, а степень метилирования – 45%. Стоит отметить, что ОПС планктонной культуры глюкозилирован на 65%, а степень его метилирования также составляла 45%. Вероятно, снижение степени глюкозилирования ОПС_{II} по сравнению с ОПС планктонной культуры, связано с альтернативным вариантом функционирования системы постсинтетических модификаций ОПС, который «запускается» при переходе от планктонного культивирования к образованию биопленок. Так, для ризосферных бактерий *Pseudomonas chlororaphis* было показано, что ОПС планктонной культуры и биопленок имеют сходную структуру, за исключением степени *O*-ацетилирования, которое существенно снижается при формировании биопленок (Zdrovenko *et al.*, 2015). Таким образом, из наружной мембраны клеток биопленок *A. halopraeferens* Au4 выделили два ПС: один представляет собой ОПС, сходный по строению с ОПС планктонной культуры, а второй является глюканом, причем является ли данный ПС одной из цепей ОПС ЛПС или продуцируется клетками в качестве резервного ПС, остается не выясненным.

ПС на основе Glc часто обнаруживаются в составе ВПМ (Armitano *et al.*, 2014). *P. aeruginosa* продуцируют, по крайней мере, три различных ЭПС, участвующих в образовании биопленок и определяющих их архитектуру: альгинат, Pel и Psl. Pel-подобные ПС, состоящие преимущественно из остатков Glc, имеют важное значение для формирования биопленок без постоянного перемешивания (Friedman and Kolter, 2004; Ryder *et al.*, 2007). На основании обнаружения Glc составе ВПМ биопленок *A. halopraeferens* Au4 можно предположить, что помимо ЛПС, углеводная составляющая матрикса представлена глюканом.



Арабские цифры соответствуют протонам в моносахаридных остатках:

R, Rha; F, Fuc; X, Xyl; G, Glc; R2Me, Rha2OMe.

Рисунок 23 – Спектры ^1H -ЯМР образцов ОПС (А) и ОПС_{II} (Б), полученных из ЛПС планктонной культуры и биопленок бактерий *A. halopraeferens* Au4

Полученные нами данные свидетельствуют о многокомпонентности состава ВПМ биопленок как эндофитного, так и галотолерантного штамма азоспирилл, сформированных при стационарном культивировании. Превалирование белковой компоненты над полисахаридной характерно для ВПМ биопленок, которые формировались в естественных для бактерий условиях, например, в канализационных трубах, либо активном иле (Flemming and Wingender, 2010).

Проведенные нами исследования показали, что образование глюканов как дополнительной формы гликополимеров поверхности характерно для бактерий

рода *Azospirillum* при варьировании условий среды обитания. Причем этот механизм реализуется в равной степени у эндофитного штамма *A. baldaniorum* Sp245 (настоящая работа), эктосимбионтов (Del Gallo and Naegi, 1990; Коннова и др., 2003) и галотолерантных азоспирилл (настоящая работа). Пусковым фактором продукции глюканов может служить изменение условий роста бактерий при периодическом культивировании в средах с различными источниками углерода, по мере роста в которых наблюдается повышение рН среды (среда с малатом натрия), либо его снижение (среда с фруктозой), а также варьирование соотношения источника углерода к азоту в среде культивирования и т.д. Очевидно, что продукция дополнительного гомоглюкана в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий рода *Azospirillum* является их единой адаптивной реакцией на стрессовые факторы различной природы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биопрепараты, увеличивающие урожайность сельскохозяйственных растений, составляют серьезную конкуренцию традиционным химическим удобрениям. Финансовые затраты на их продукцию несоизмеримо ниже, а негативное воздействие на окружающую среду минимально. В последнее время в мировой практике разработан ряд препаратов, основу которых составляют полезные штаммы клубеньковых и ассоциативных ризобактерий из родов *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* и т.д. (Compart *et al.*, 2005; Granér *et al.*, 2003; Чеботарь и др., 2015).

Бактерии рода *Azospirillum* играют ключевую роль в современной агробиотехнологии. Азоспириллы входят в состав многих биопрепаратов, например, представители вида *A. brasilense* составляют основу Азоризина, а бактерии *A. zeae* – Органита Н. Крайне разнообразны функции, которые выполняют ризобактерии *Azospirillum*, заселяя корневую систему растений. Они участвуют в азотфиксации, восстановлении нитратов, продукции различных биологически активных веществ, среди которых фитогормоны и сидерофоры. Помимо этого, азоспириллы способны защищать растения от фитопатогенных обитателей ризосферы и ризопланы (Bashan and de-Bashan, 2010). Крайне важным свойством азоспирилл является их участие в разрушении ксенобиотиков различной природы (Турковская и Муратова, 2005). Многообразие функций наряду с устойчивостью азоспирилл к негативным воздействиям окружающей среды лежат в основе применения данных бактерий в составе биоудобрений.

В работе (Okon and Labandera-Gonzalez, 1994) утверждается, что по итогам порядка 60-70% инокуляционных экспериментов с бактериями рода *Azospirillum* отмечается увеличение урожайности растений на 5-30%, причем это повышение является статистически достоверным. Примерно в 30-40% экспериментов не было получено данных касательно повышения урожайности. Такое расхождение при инокуляции во многом определяется недостаточной изученностью процесса формирования азотфиксирующей ассоциации.

На начальных этапах становления ассоциативных отношений с растениями со стороны бактерий принимают участие экстраклеточные и мембранные гликаны: ЭПС, КПС и ЛПС (Skvortsov and Ignatov, 1998). Изучение состава и структуры данных биополимеров, в частности, при варьировании условий выращивания и при влиянии стрессоров различной природы, позволит сформулировать представления о конкретном симбиотическом фенотипе азоспирилл. Такой набор оптимальных по структуре ЭПС, КПС и ЛПС упростит реализацию «молекулярного диалога» с растениями, а также повысит эффективность ассоциативных взаимоотношений. На момент проведения нашего исследования сведения о вариабельности гликополимеров поверхности азоспирилл носили отрывочный и бессистемный характер.

В настоящей работе исследовали структуру ЛПБК из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, поскольку данные об особенностях организации капсулы азоспирилл относились лишь к одному штамму *A. lipoferum* Sp59b. Оказалось, что ПС, выделенный из ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245, идентичен по структуре ОПС в составе ЛПС и содержит пентарамнановое повторяющееся звено. Молекулярная мимикрия ЛПС и их экстраклеточных форм в виде ЛПБК, вероятно, напрямую влияет на реализацию различных механизмов ассоциативных взаимоотношений бактерий с растениями на уровне экто- и эндосимбиоза.

Впервые в нашей работе были выделены, идентифицированы и охарактеризованы белки в составе ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245. Белок OmaA является порином и по литературным данным принимает участие в реализации молекулярных механизмов формирования растительно-микробных ассоциаций. Функция OmpW-подобного белка для азоспирилл пока не установлена, но его присутствие в ЛПБК, вероятно, также обусловлено адаптационной стратегией к повышению эффективности взаимодействий с растениями в природной среде обитания.

Было изучено влияние условий культивирования (природа источника углерода в питательной среде и продолжительность выращивания), а также температурного и солевого стрессов на состав и структуру ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Выбранные факторы воздействия предоставили возможность оценить адаптивную роль гликанов поверхности азоспирилл, которая

не только способствует выживанию бактерий в свободноживущем состоянии в почве, но и обеспечивает устойчивость ассоциаций. Показано, что в экстраклеточных и мембранных гликополимерах данного штамма при выращивании в среде с фруктозой, а также при повышенной температуре и при содержании NaCl в среде 250 мМ происходит индукция синтеза дополнительного гомоглюкана. Роль подобных глюканов пока остается невыясненной, но не исключено, что данные ПС выполняют важную роль при различных стрессовых воздействиях. Так, гомоглюканы могут образовывать фибриллярный защитный слой на поверхности клеток, вероятно, также вовлеченный в стадию прочного прикрепления азоспирилл к корням растений.

Естественной формой существования бактерий в природной среде обитания являются биопленочные сообщества (Смирнова и др., 2010). В связи с этим, мы провели характеристику особенностей формирования биопленок эндофитным *A. baldaniorum* Sp245 и галотолерантным *A. halopraeferens* Au4 штаммами. Сравнение структуры гликополимеров поверхности планктонной и биопленочной культур, а также определение состава внеклеточного матрикса позволило установить основные закономерности изменения компонентов клеточной стенки азоспирилл при переходе от одной культуральной формы к другой. Было выявлено, что ЛПС планктонной и биопленочной форм *A. baldaniorum* Sp245 сходны по составу и структуре. Однако, при формировании биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 синтезируют в составе ЛПС О-полисахарид с меньшей степенью глюкозилирования, а также дополнительный гомоглюкан. В ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 были обнаружены белковые молекулы в широком диапазоне молекулярных масс ~20-80 кДа, а также углеводная составляющая, представленная молекулами ЛПС. В случае галотолерантного штамма в ВПМ выявили глюкан, идентичный по структуре гомоглюкану в составе ЛПС биопленочной культуры. Поскольку бактерии обитают на поверхности корней преимущественно в составе биопленок, подобные исследования играют ключевую роль для установления основ растительно-микробных взаимодействий.

Стратегия синтеза гомоглюканов бактериями рода *Azospirillum* при изменении факторов среды была обнаружена нами впервые. Такая защитная

реакция азоспирилл вызывает интерес для дальнейших исследований, поскольку открывает перспективы создания оптимального симбиотического фенотипа данных бактерий, который бы позволял не только успешно адаптироваться к стрессовым факторам, но и продуктивно взаимодействовать с растениями, независимо от внешних воздействий.

Полученные результаты расширяют представление об адаптационных возможностях бактерий рода *Azospirillum* по отношению к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также об особенностях образования биопленок. Учитывая, что азоспириллы используются в составе комплексных биоудобрений, данная работа поможет оптимизировать их внедрение на территории Российской Федерации, независимо от климатических зон и типа почв. Многие штаммы азоспирилл, вступающие в ассоциативные отношения с ценным для сельского хозяйства зерновыми и кормовыми культурами, могут служить основой для создания универсальных микробных удобрений, применение которых станет возможно не только в пределах нашей страны, но и за рубежом.

В развитии данной диссертационной работы может быть осуществлен анализ геномов исследуемых штаммов для поиска генов, ответственных за синтез модифицированных экстраклеточных и мембранных гликанов в стрессовых условиях и при формировании биопленок; мутагенез, направленный на выключение этих генов, для подтверждения важности изменений в структуре поверхностных гликополимеров при выживании азоспирилл в почве; анализ эффективности заселения корневой системы растений азоспириллами при солевом и температурном стрессах с последующей оценкой урожайности выбранных для этого сельскохозяйственных культур.

ВЫВОДЫ

1. Структуры О-полисахарида и полисахарида, полученных из липополисахарида и липополисахарид-белкового комплекса *A. baldaniorum* Sp245, соответственно, являются идентичными. Впервые в составе липополисахарид-белкового комплекса капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 были обнаружены два белка – порин OmaA и канал-образующий OmpW-подобный белок.

2. Природа источника углерода в питательной среде и фаза роста культуры влияют на содержание углеводов и остатков фосфорной кислоты, а также на соотношение ЖК в составе капсульных полисахаридов и липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Аналогичные изменения экстраклеточных и мембранных гликополимеров исследуемого штамма были показаны при температурном и солевом стрессах.

3. Культивирование бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов индуцирует синтез гомоглюкана в составе как экстраклеточных, так и мембранных гликополимеров.

4. Впервые охарактеризованы препараты липополисахаридов из сформированных биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Для планктонной и биопленочной культур *A. baldaniorum* Sp245 не выявили существенных отличий в составе и структуре липополисахаридов. Для липополисахаридов бактерий *A. halopraeferens* Au4 показан синтез дополнительного глюкана и снижение степени гликозилирования О-полисахарида при переходе от планктонной формы к образованию биопленок.

5. Внеклеточные полимерные матрицы биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 являются многокомпонентными и в их составе преобладают белковые молекулы в широком диапазоне молекулярных масс. Углеводная составляющая матриц обоих штаммов представлена молекулами липополисахаридов, а в случае галотолерантного штамма содержит также гомоглюкан.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при отборе штаммов бактерий рода *Azospirillum* с оптимальным симбиотическим фенотипом. Совокупность сведений об особенностях структуры экстраклеточных и мембранных гликополимеров данных ризобактерий, в том числе наблюдаемых при изменении условий окружающей среды, может быть востребована для повышения эффективности их интродукции в почву с целью увеличения урожайности злаковых культур. Регуляция структуры и свойств гликополимеров поверхности азоспирилл может быть использована в технологии создания принципиально новых биоудобрений для широкого круга растений вне зависимости от погодноклиматических условий и состояния почв. Применение таких биопрепаратов позволит существенно снизить химическую нагрузку на агрогеннопреобразованные почвы и увеличить экономическую рентабельность при возделывании злаков без нанесения вреда окружающей среде.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЗП	– агглютинин зародышей пшеницы
ВПМ	– внеклеточный полимерный матрикс
ГЖХ	– газожидкостная хроматография
ДСН	– додецилсульфат натрия
ДТТ	– дитиотреитол
ЖК	– жирная кислота
кДа	– килодальтон
КПС	– капсульный полисахарид
ЛПБК	– липополисахарид-белковый комплекс
ЛПС	– липополисахарид
МЭЖК	– метиловый эфир жирной кислоты
ОПС	– О-специфический полисахарид
ПГБ	– полигидроксibuтират
ПС	– полисахарид
ПСЛК	– полисахарид-липидный комплекс
ТРИТЦ	– тетраметилродамин изотиоцианат
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПС	– экзополисахарид
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
Vfp	– пучок пилей на одном из полюсов клетки (bundle-forming pilus)
COSY	– гомоядерная корреляционная спектроскопия (COrrelation SpectroscopY)
Fla	– полярный жгутик (polar flagellum)
Fuc	– фукоза (fucose)
Gal	– галактоза (galactose)
Glc	– глюкоза (glucose)
GlcNAc	– N-ацетилглюкозамин (N-acetylglucosamine)
HMBC	– гетероядерная корреляционная спектроскопия через

	несколько связей (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	– гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия (Heteronuclear Single-Quantum Coherence)
Kdo	– 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота (2-keto-3-deoxyoctulosonic acid)
Laf	– латеральные жгутики (lateral flagella)
MAMP	– ассоциированные с микроорганизмами молекулярные паттерны (microbe-associated molecular pattern)
MOMP	– основной белок наружной мембраны (major outer-membrane protein)
NOESY	– ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
<i>p</i>	– пираноза (pyranose)
Pel	– полисахарид с высоким содержанием глюкозы в составе матрикса биопленок бактерий <i>P. aeruginosa</i> (pellicule)
PGPR	– ризобактерии, стимулирующие рост растений (plant-growth-promoting rhizobacteria)
PR	– патоген-зависимые белки (pathogenesis-related proteins)
Psl	– полисахарид с высоким содержанием маннозы в составе матрикса биопленок бактерий <i>P. aeruginosa</i> (продукт генов <i>psl</i> , polysaccharide synthesis locus)
QS	– «чувство кворума» (quorum sensing)
Rha	– рамноза (rhamnose)
Rha2OMe	– 2- <i>O</i> -метилрамноза (2- <i>O</i> -methylrhamnose)
ROESY	– ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера во вращающейся системе координат (Rotating-frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
TOCSY	– полная корреляционная спектроскопия (TOtal Correlation Spectroscopy)
Xyl	– ксилоза (xylose)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аленькина, С.А. Получение и характеристика мутанта *Azospirillum brasilense* Sp7 по лектиновой активности / С.А. Аленькина, Л.П. Петрова, В.Е. Никитина // Микробиология. – 1998. – Т. 67, №6. – С. 782-787.
2. Аленькина, С.А. Сравнительное изучение влияния лектинов *Azospirillum brasilense* Sp7 и его мутанта на активность некоторых ферментов растительной клетки / С.А. Аленькина, О.А. Паюсова, В.Е. Никитина // Микробиология. – 2004. – Т. 73, №6. – С. 849-850.
3. Аленькина, С.А. Сравнительная оценка индуктивного воздействия различных по антигенным свойствам лектинов азоспирилл на сигнальные системы корней проростков пшеницы / С.А. Аленькина, Л.П. Петрова, М.К. Соколова, М.П. Чернышова, К.А. Трутнева, В.А. Богатырев, В.Е. Никитина // Микробиология. – 2014. – Т. 83, №3. – С. 336-345.
4. Антонюк, Л.П. О роли агглютинина зародышей пшеницы в растительно-бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку / Л.П. Антонюк, В.В. Игнатов // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, №3. – С. 427-433.
5. Антонюк, Л.П. Лектин пшеницы как фактор растительно-микробной коммуникации и белок стрессового ответа / Л.П. Антонюк, Н.В. Евсеева // Микробиология. – 2006. – Т. 75, №4. – С. 544-549.
6. Бойко, А.С. Особенности структуры О-полисахаридов азоспирилл серогруппы I / А.С. Бойко, О.Н. Смолькина, Ю.П. Федоненко, Э.Л. Здоровенко, В.В. Качала, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №2. – С. 219-227.
7. Бурьгин, Г.Л. Выявление чехла на поверхности полярного жгутика *Azospirillum brasilense* / Г.Л. Бурьгин, А.А. Широков, А.В. Шелудько, Е.И. Кацы, С.Ю. Щёголев, Л.Ю. Матора // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №6. – С. 822-829.
8. Егоренкова, И.В. Исследование начальных этапов взаимодействия бактерий *Azospirillum brasilense* с корнями проростков пшеницы: адсорбции,

деформации корневых волосков / И.В. Егоренкова, С.А. Коннова, И.М. Скворцов, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2000. – Т. 69, №1. – С. 120-126.

9. Егоренкова, И.В. Роль полисахаридсодержащих компонентов капсулы *Azospirillum brasilense* в адсорбции бактерий на корнях проростков пшеницы / И.В. Егоренкова, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, Л.А. Дыкман, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №1. – С. 45-50.

10. Егоров, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егоров // М.: Изд-во МГУ. – 1995. – 224 с.

11. Захарова, И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко // Киев: Наук. думка. – 1982. – 192 с.

12. Игнатов, В.В. Характеристика состава жирных кислот липидов А липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* / В.В. Игнатов, О.Н. Коннова, А.С. Бойко, А.А. Фомина, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2009. – Т. 9, №1. – С.36-41.

13. Иосипенко, О.А. Лектины корней проростков пшеницы в процессах взаимодействия растения с ассоциативными микроорганизмами рода *Azospirillum* / О.А. Иосипенко, Г.И. Стадник, В.В. Игнатов // Прикл. биохим. и микробиол. – 1996. – Т. 32, №4. – С. 458-461.

14. Каневский, М.В. Влияние флавоноидов на состав гликополимеров поверхности *Azospirillum lipoferum* Sp59b / М.В. Каневский, С.А. Коннова, А.С. Бойко, Ю.П. Федоненко, Е.Н. Сигида, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2014. – Т. 83, №2. – С. 143-151.

15. Коннова, С.А. Исследование защитной роли полисахаридсодержащих компонентов капсулы бактерий *Azospirillum brasilense* / С.А. Коннова, О.С. Брыкова, О.А. Сачкова, И.В. Егоренкова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №4. – С. 503-508.

16. Коннова, С.А. Исследование влияния условий выращивания бактерий *Azospirillum brasilense* на состав их внеклеточных полисахаридсодержащих материалов / С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, О.Е. Макаров, В.В. Игнатов // Изв. РАН. Сер. биол. – 2003. – Вып. 4. – С. 430-437.

17. Коннова, О.Н. Химический состав и иммунохимическая характеристика липополисахарида азотфиксирующих ризобактерий *Azospirillum*

brasiliense Cd / О.Н. Коннова, Г.Л. Бурыгин, Ю.П. Федоненко, Л.Ю. Матора, К.Е. Панкин, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2006. – Т. 75, №3. – С. 383-388.

18. Кравченко, Л.В. Состав корневых экзометаболитов мягкой пшеницы и томата, влияющих на растительно-микробные взаимодействия в ризосфере / Л.В. Кравченко, А.И. Шапошников, Н.М. Макарова, Т.С. Азарова, К.А. Львова, И.И. Костюк, О.А. Ляпунова, И.А. Тихонович // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, №5. – С. 781-786.

19. Кульшин, В.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий / В.А. Кульшин, А.П. Яковлев, С.Н. Аваева, Б.А. Дмитриев // Мол. генетика, микробиология и вирусология. – 1987. – №5. – С. 44-46.

20. Лакин, Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для биол. спец. вузов, 4-е изд., перераб. и доп. / Г.Ф. Лакин // М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.

21. Матора, Л.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasiliense* / Л.Ю. Матора, С.Ю. Щёголев // Микробиология. – 2002. – Т. 71, №2. – С. 211-214.

22. Матора, Л.Ю. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasiliense* / Л.Ю. Матора, О.Б. Серебренникова, Л.П. Петрова, Г.Л. Бурыгин, С.Ю. Щёголев // Микробиология. – 2003. – Т. 72, №1. – С. 60-63.

23. Мулюкин, А.Л. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasiliense* / А.Л. Мулюкин, Н.Е. Сузина, А.Ю. Погорелова, Л.П. Антонюк, В.И. Дуда, Г.И. Эль-Регистан // Микробиология. – 2009. – Т. 78, №1. – С. 42-51.

24. Муратова, А.Ю. Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* / А.Ю. Муратова, О.В. Турковская, Л.П. Антонюк, О.Е. Макаров, Л.И. Позднякова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2005. – Т. 74, №2. – С. 248-254.

25. Нижников, А.А. Амилоиды: от патогенеза к функции (обзор) / А.А. Нижников, К.С. Антоненц, С.Г. Инге-Вечтомов // Биохимия. – 2015. – Т. 80, №9. – С. 1356-1375.

26. Никитина, В.Е. Очистка и сравнение лектинов с клеточной поверхности активных и неактивных по гемагглютинации клеток азоспирилл / В.Е.

Никитина, С.А. Аленькина, Ю.В. Итальянская, Е.Г. Пономарева // Биохимия. – 1994. – Т. 59, №5. – С.656-662.

27. Никитина, В.Е. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы / В.Е. Никитина, С.А. Аленькина, Е.Г. Пономарева, Н.Н. Савенкова // Микробиология. – 1996. – Т. 65, №2. – С. 165-170.

28. Никитина, В.Е. Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл / В.Е. Никитина, Е.Г. Пономарева, С.А. Аленькина, С.А. Коннова // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №4. – С. 471-476.

29. Никитина, В.Е. Влияние условий культивирования на лигнин-пероксидазную активность эндофитного и эпифитного штаммов *Azospirillum brasilense* / В.Е. Никитина, М.А. Купряшина, С.В. Петров, Е.В. Глинская // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2012. – Т. 12, №4. – С.52-56.

30. Никовская, Г.Н. Гидрофильно-гидрофобные свойства микроорганизмов при различных условиях культивирования / Г.Н. Никовская, А.С. Гордиенко, Л.И. Глоба // Микробиология. – 1989. – Т. 58, №3. – С. 448-451.

31. Петрова, Л.П. Плазмидные перестройки и изменения в формировании биопленок *Azospirillum brasilense* / Л.П. Петрова, А.В. Шелудько, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №1. – С. 129-132.

32. Сигида, Е.Н. Характеристика липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum*, отнесенных к серогруппе II / Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, Э.Л. Здоровенко, Г.Л. Бурыгин, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2014. – Т. 83, №4. – С. 416-425.

33. Сигида, Е.Н. Структура О-специфического полисахарида и липида А типового штамма бактерий *Azospirillum rugosum* DSM-19657 / Е.Н. Сигида, М.С. Кокоулин, П.С. Дмитренко, В.С. Гринёв, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Биоорганическая химия. – 2020. – Т. 46, №1. – С. 65-76.

34. Скоупс, Р.К. Методы очистки белков. Перевод с англ. В.К. Антонова / Р.К. Скоупс // М.: Мир. – 1985. – 358 с.

35. Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, Р.Р. Азизбекян, Ю.М. Романова // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №4. – С. 435-446.
36. Смолькина, О.Н. Капсульный полисахарид бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b: структура, антигенная специфичность / О.Н. Смолькина, В.В. Качала, Ю.П. Федоненко, Г.Л. Бурьгин, Э.Л. Здоровенко, Л.Ю. Матора, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Биохимия. – 2010. – Т. 75, №5. – С. 707-716.
37. Суркина, А.К. Гликополимеры бактерий рода *Azospirillum* как перспективные антагонисты классических эндотоксинов / А.К. Суркина, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, В.В. Игнатов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2013. – Т. 13, №2. – С.78-85.
38. Суркина, А.К. Влияние условий выращивания бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b на биологическую активность их гликополимеров / А.К. Суркина, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2017. – Т. 17, №2. – С.177-183.
39. Телешева, Е.М. Анализ влияния протеаз на структуру биопленок штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его дефектных по жгутикованию *mmsB1* и *fabG1* мутантов / Е.М. Телешева, Д.Н. Синякин, А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, Е.Г. Пономарева, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2017. – Т. 17, №3. – С. 322-327.
40. Турковская, О.В. Биодegradация органических поллютантов в корневой зоне растений / О.В. Турковская, А.Ю. Муратова // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциированных микроорганизмов с растениями / Отв. ред. В.В. Игнатов. – М.: Наука, 2005. – С. 180-208.
41. Федоненко, Ю.П. Участие липополисахаридов азоспирилл в взаимодействии с поверхностью корней пшеницы / Ю.П. Федоненко, И.В. Егоренкова, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №3. – С. 384-390.
42. Федоненко, Ю.П. Структурные особенности О-специфических полисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III / Ю.П. Федоненко, А.С. Бойко, Э.Л. Здоровенко, С.А. Коннова, А.С. Шашков, В.В. Игнатов, Ю.А. Книрель // Биохимия. – 2011. – Т.76, №7. – С. 976-982.

43. Федоненко, Ю.П. Структура и серология O-антигенов азотфиксирующих ризобактерий рода *Azospirillum* / Ю.П. Федоненко, Е.Н. Сигида, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Изв. АН. Сер. хим. – 2015. – №5. – С. 1024-1031.
44. Филипьева, Ю.А. О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* / Ю.А. Филипьева, Е.М. Телешева, С.С. Евстигнеева, А.В. Шелудько, Е.Г. Пономарева, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, №4. – С. 399-406.
45. Фомина, А.А. Биохимические и гематологические показатели у мышей при введении ЛПС *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.А. Фомина, М.Л. Малинин, С.А. Коннова, Е.И. Тихомирова // Токсикологический вестник. – 2009а. – №6. – С. 52-53.
46. Фомина, А.А. Особенности строения и биологические свойства липополисахаридов азоспирилл в отношении активации факторов неспецифической резистентности макроорганизма / А.А. Фомина, А.В. Петров, С.А. Коннова, А.С. Бойко, Ю.П. Федоненко, Е.И. Тихомирова, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2009b. – Т. 8, №4. – С. 23-27.
47. Чеботарь, В.К. Эндофитные бактерии в микробных препаратах, улучшающих развитие растений (обзор) / В.К. Чеботарь, Н.В. Мальфанова, А.В. Щербаков, Г.А. Ахтемова, А.Ю. Борисов, Б. Люгтенберг, И.А. Тихонович // Прикл. биохим. и микробиол. – 2015. – Т. 51, №3. – С. 283-289.
48. Чернышова, М.П. Внеклеточные протеолитические ферменты штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и регулирование их активности гомологичным лектином / М.П. Чернышова, С.А. Аленькина, В.Е. Никитина, В.В. Игнатов // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41, №4. – С. 444-453.
49. Шелудько, А.В. Образование на клетке *Azospirillum brasilense* полярного пучка пилей и поведение бактерий в полужидком агаре / А.В. Шелудько, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2001. – Т. 70, №5. – С. 662-667.
50. Шелудько, А.В. Влияние конго красного на подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, И.В. Борисов, В.А. Крестиненко, В.И. Панасенко, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2006. – Т. 75, №1. – С. 62-69.

51. Шелудько, А.В. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, О.В. Кулибякина, А.А. Широков, Л.П. Петрова, Л.Ю. Матора, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2008. – Т. 77, №3. – С. 358-363.
52. Шелудько, А.В. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью / А.В. Шелудько, А.А. Широков, М.К. Соколова, О.И. Соколов, Л.П. Петрова, Л.Ю. Матора, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №5. – С. 696-704.
53. Шелудько, А.В. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, Е.М. Шумилова, Б.Н. Хлебцов, А.М. Буров, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2015. – Т. 84, №2. – С. 175-183.
54. Шумилова, Е.М. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* / Е.М. Шумилова, А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, С.С. Евстигнеева, Е.Г. Пономарева, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Микробиология. – 2016. – Т. 85, №2. – С. 162-170.
55. Aeron, A. Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future / A. Aeron, E. Khare, C.K. Jha, V.S. Meena, S.M.A. Aziz, M.T. Islam, K. Kim, S.K. Meena, A. Pattanayak, H. Rajashekara, R.C. Dubey, B.R. Maurya, D.K. Maheshwari, M. Saraf, M. Choudhary, R. Verma, H.N. Meena, A.R.N.S. Subbanna, M. Parihar, S. Shukla, G. Muthusamy, R.S. Bana, V.K. Bajpai, Y.K. Han, M. Rahman, D. Kumar, N.P. Singh, R.K. Meena // Arch. Microbiol. – 2020. – Vol. 202, No. 4. – P. 665-676.
56. Al-Mailem, D.M. Bioremediation of hydrocarbons contaminating sewage effluent using man-made biofilms: effects of some variables / D.M. Al-Mailem, M.K. Kansour, S.S. Radwan // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2014. – Vol. 174, No. 5. – P. 1736-1751.
57. Alami, Y. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from

sunflower roots / Y. Alami, W. Achouak, C. Marol, T. Heulin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, No. 8. – P. 3393-3398.

58. Alamri, S.A. Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* Sp-248 on the response of wheat to seawater irrigation / S.A. Alamri, Y.S. Mostafa // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2009. – Vol. 16, No. 2. – P. 101-107.

59. Alexander, C. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity / C. Alexander, E.T. Rietschel // *J. Endotoxin Res.* – 2001. – Vol. 7, No. 3. – P. 167-202.

60. Alexandre, G. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense* / G. Alexandre, S.E. Greer, I.B. Zhulin // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182, No. 21. – P. 6042-6048.

61. Altona, C. Prediction of *anti* and *gauche* vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings / C. Altona, C.A.G. Haasnoot // *Org. Magn. Reson.* – 1980. – Vol. 13, No. 6. – P. 417-429.

62. Anandham, R. *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products / R. Anandham, J. Heo, R. Krishnamoorthy, M. Senthil-Kumar, N.O. Gopal, S.J. Kim, S.W. Kwon // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69, No. 5. – P. 1369-1375.

63. Antonets, K.S. Exploring proteins containing amyloidogenic regions in the proteomes of bacteria of the order *Rhizobiales* / K.S. Antonets, S.F. Kliver, A.A. Nizhnikov // *Evol. Bioinform. Online.* – 2018. – Vol. 14. – P. 1-12

64. Armitano, J. Gram-negative bacteria can also form pellicles / J. Armitano, V. Méjean, C. Jourlin-Castelli // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2014. – Vol. 6, No. 6. – P. 534-544.

65. Arruebarrena Di Palma, A. Denitrification-derived nitric oxide modulates biofilm formation in *Azospirillum brasilense* / A. Arruebarrena Di Palma, C.M. Pereyra, L. Moreno Ramirez, M.L. Xiqui Vázquez, B.E. Baca, M.A. Pereyra, L. Lamattina, C.M. Creus // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2013. – Vol. 338, No. 1. – P. 77-85.

66. Bagos, P.G. Finding beta-barrel outer membrane proteins with a Markov Chain Model / P.G. Bagos, T.D. Liakopoulos, J.S. Hamodrakas // *WSEAS Trans. Biol. Biomed.* – 2004a. – Vol. 1, No. 2. – P. 186-189.

67. Bagos, P.G. PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of β -barrel outer membrane proteins / P.G. Bagos, T.D. Liakopoulos, I.C. Spyropoulos, S.J. Hamodrakas // *Nucleic Acids Res.* – 2004b. – Vol. 32, No. W1. – P. W400-W404.
68. Bahat-Samet, E. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense* / E. Bahat-Samet, S. Castro-Sowinski, Y. Okon // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 237, No. 2. – P. 195-203.
69. Baldani, V.L.D. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat / V.L.D. Baldani, J.I. Baldani, J. Döbereiner // *Can. J. Microbiol.* – 1983. – Vol. 29, No. 8. – P. 924-929.
70. Bar-Ness, E. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants / E. Bar-Ness, Y. Chen, Y. Hadar, H. Marschner, V. Römheld // *Plant Soil.* – 1991. – Vol. 130. – P. 231-241.
71. Bashan, Y. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996) / Y. Bashan, G. Holguin // *Can. J. Microbiol.* – 1997. – Vol. 43, No. 2. – P. 103-121.
72. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997– 2003) / Y. Bashan, G. Holguin, L.E. de-Bashan // *Can. J. Microbiol.* – 2004. – Vol. 50, No. 8. – P. 521-577.
73. Bashan, Y. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment / Y. Bashan, L.E. de-Bashan // *Adv. Agron.* – 2010. – Vol. 108. – P. 77-136.
74. Becking, J.H. Fixation of molecular nitrogen by an aerobic *Vibrio* or *Spirillum* sp. / J.H. Becking // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 1963. – Vol.29. – P. 326.
75. Beerten, J. WALTZ-DB: a benchmark database of amyloidogenic hexapeptides / J. Beerten, J. Van Durme, R. Gallardo, E. Capriotti, L. Serpell, F. Rousseau, J. Schymkowitz // *Bioinformatics.* – 2015. – Vol. 31, No. 10. – P. 1698-1700.
76. Beijerinck, M.W. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann? / M.W. Beijerinck // *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II.* – 1925. – B. 63. – S. 353-359.
77. Belyakov, A.Ye. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7 / A.Ye. Belyakov, G.L. Burygin,

N.P. Arbatsky, A.S. Shashkov, N.Yu. Selivanov, L.Yu. Matora, Yu.A. Knirel, S.Yu. Shchyogolev // *Carbohydr. Res.* – 2012. – Vol. 361. – P.127-132.

78. Ben Dekhil, S. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. / S. Ben Dekhil, M. Cahill, E. Stackebrandt, L.I. Sly // *Syst. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol. 20, No. 1. – P. 72-77.

79. Benkert, P. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models / P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede // *Bioinformatics.* – 2011. – Vol. 27, No. 3. – P. 343-350.

80. Berenblum, I. An improved method for the colorimetric determination of phosphate / I. Berenblum, E. Chain // *Biochem. J.* – 1938. – Vol. 32, No. 2. – P. 295-298.

81. Bhattacharya, P. Mode of utilization of amino acids as growth substrates by *Azospirillum brasilense* / P. Bhattacharya // *Indian J. Exp. Biol.* – 2005. – Vol. 43, No. 12. – P. 1182-1191.

82. Biasini, M. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information / M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. Gallo Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42, No. W1. – P. W252-W258.

83. Bible, A.N. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* / A.N. Bible, B.B. Stephens, D.R. Ortega, Z. Xie, G. Alexandre // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, No. 19. – P. 6365-6375.

84. Bible, A. The *Azospirillum brasilense* Che1 chemotaxis pathway controls swimming velocity, which affects transient cell-to-cell clumping / A. Bible, M.H. Russell, G. Alexandre // *J. Bacteriol.* – 2012. – Vol. 194, No. 13. – P. 3343-3355.

85. Bible, A.N. Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation / A.N. Bible, G.K. Khalsa-Moyers, T. Mukherjee, C.S. Green, P. Mishra, A. Purcell, A. Aksenova, G.B. Hurst, G. Alexandre // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – Vol. 81, No. 24. – P. 8346-8357.

86. Bock, K. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides / K. Bock, C. Pedersen // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* – 1983. – Vol. 41. – P. 27-66.
87. Bottini, R. Identification of gibberellins A₁, A₃, and Iso-A₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum* / R. Bottini, M. Fulchieri, D. Pearce, R.P. Pharis // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 90, No. 1. – P. 45-47.
88. Boyko, A.S. Structural and functional peculiarities of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* SR55, isolated from the roots of *Triticum durum* / A.S. Boyko, S.A. Konnova, Yu.P. Fedonenko, E.L. Zdorovenko, O.N. Smol'kina, V.V. Kachala, V.V. Ignatov // *Microbiol. Res.* – 2011. – Vol. 166, No. 7. – P. 585-593.
89. Burdman, S. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components / S. Burdman, E. Jurkevitch, B. Schwartsburd, M. Hampel, Y. Okon // *Microbiology.* – 1998. – Vol. 144, No. 7. – P. 1989-1999.
90. Burdman, S. Involvement of outer-membrane proteins in the aggregation of *Azospirillum brasilense* / S. Burdman, E. Jurkevitch, B. Schwartsburd, Y. Okon // *Microbiology.* – 1999. – Vol. 145, No. 5. – P.1145-1152.
91. Burdman, S. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots / S. Burdman, Y. Okon, E. Jurkevitch // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2000a. – Vol. 26, No. 2. – P. 91-110.
92. Burdman, S. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation / S. Burdman, E. Jurkevitch, M.E. Soria-Díaz, A.M. Gil Serrano, Y. Okon // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2000b. – Vol. 189, No. 2. – P. 259-264.
93. Burdman, S. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation / S. Burdman, G. Dulguerova, Y. Okon, E. Jurkevitch // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2001. – Vol. 14, No. 4. – P. 555-561.
94. Carreño-López, R. Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response in *Azospirillum brasilense* Sp7 / R. Carreño-López, A. Sánchez, N.

Camargo, C. Elmerich, B.E. Baca // Arch. Microbiol. – 2009. – Vol. 191, No. 6. – P. 501-507.

95. Cassán, F. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina / F. Cassán, I. García de Salomone // Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires. – 2008. – P. 141-151.

96. Cassán, F. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum* / F. Cassán, J. Vanderleyden, S. Spaepen // J. Plant Growth Regul. – 2014. – Vol. 33, No. 2. – P. 440-459.

97. Castellanos, T. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. / T. Castellanos, F. Ascencio, Y. Bashan // Curr. Microbiol. – 1998. – Vol. 36, No. 4. – P. 241-244.

98. Castro-Sowinski, S. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms / S. Castro-Sowinski, Y. Herschkovitz, Y. Okon, E. Jurkevitch // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 276, No. 1. – P. 1-11.

99. Choma, A. Chemical composition of lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum* / A. Choma, R. Russa, Z. Lorkiewicz // FEMS Microbiol. Lett. – 1984. – Vol. 22, No. 3. – P. 245-248.

100. Choma, A. Chemical analysis of *Azospirillum* lipopolysaccharides / A. Choma, R. Russa, H. Mayer, Z. Lorkiewicz // Arch. Microbiol. – 1987. – Vol. 146, No. 4. – P. 341-345.

101. Choma, A. Characterization of a novel lipid A structure isolated from *Azospirillum lipoferum* lipopolysaccharide / A. Choma, I. Komanięcka // Carbohydr. Res. – 2008. – Vol. 343, No. 4. – P. 799-804.

102. Chowdhury, S.P. Strain-specific salt tolerance and osmoregulatory mechanisms in *Azospirillum brasilense* / S.P. Chowdhury, T. Nagarajan, R. Tripathi, M.N. Mishra, D. Le Rudulier, A.K. Tripathi // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 267, No. 1. – P. 72-79.

103. Cohen, A.C. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants / A.C. Cohen, R. Bottini, P.N. Piccoli // Plant Growth Regul. – 2008. – Vol. 54. – P. 97-103.

104. Cohen, A.C. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels / A.C. Cohen, R. Bottini, M. Pontin, F.J. Berli, D. Moreno, H. Boccanlandro, C.N. Travaglia, P.N. Piccoli // *Physiol. Plant.* – 2015. – Vol. 153, No. 1. – P. 79-90.
105. Combes-Meynet, E. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion / E. Combes-Meynet, J.F. Pothier, Y. Moënne-Loccoz, C. Prigent-Combaret // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2011. – Vol. 24, No. 2. – P. 271-284.
106. Compant, S. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects / S. Compant, B. Duffy, J. Nowak, C. Clément, E.A. Barka // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, No. 9. – P. 4951-4959.
107. Coulon, C. Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14 / C. Coulon, E. Vinogradov, A. Filloux, I. Sadovskaya // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, No. 12. – P. e14220 (1-10).
108. Croes, C.L. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots / C.L. Croes, S. Moens, E. van Bastelaere, J. Vanderleyden, K.W. Michiels // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – Vol. 139, No. 9. – P. 2261-2269.
109. Curá, J.A. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress / J.A. Curá, D.R. Franz, J.E. Filosofía, K.B. Balestrasse, L.E. Burgueño // *Microorganisms.* – 2017. – Vol. 5, No. 3. – P. 41 (1-16).
110. Dahm, H. Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures / H. Dahm, H. Rózycki, E. Strzelczyk, C.Y. Li // *Zentralbl. Mikrobiol.* – 1993. – Vol. 148, No. 3. – P. 195-203.
111. Danhorn, T. Biofilm formation by plant-associated bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 61. – P. 401-422.
112. Das, A. Utilization of fructose by *Azospirillum brasilense* / A. Das, A.K. Mishra // *Can. J. Microbiol.* – 1983. – Vol. 29. – P. 1213-1217.

113. De Groot, N.S. AGGREGSCAN: method, application, and perspectives for drug design / N.S. de Groot, V. Castillo, R. Graña-Montes, S. Ventura Zamora // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 819. – P. 199-220.
114. Del Gallo, M. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* / M. Del Gallo, M. Negi, C.A. Neyra // *J. Bacteriol.* – 1989. – Vol. 171, No. 6. – P. 3504-3510.
115. Del Gallo, M. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* / M. Del Gallo, A. Haegi // *Symbiosis.* – 1990. – Vol. 9. – P. 155-161.
116. Del Gallo, M.M. The rhizosphere and *Azospirillum* / M.M. Del Gallo, I. Fendrik // *Azospirillum-plant associations* / Ed. Y. Okon. – CRC Press, Boca Raton. – 1994. – P. 57-75.
117. Döbereiner, J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses / J. Döbereiner, J.M. Day, P.J. Dart // *Plant Soil.* – 1972. – Vol. 37, No. 1. – P. 191-196.
118. Döbereiner, J. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck / J. Döbereiner, I.E. Marriel, M. Nery // *Can. J. Microbiol.* – 1976. – Vol. 22, No. 10. – P. 1464-1473.
119. Döbereiner, J. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites / J. Döbereiner, J.M. Day // *Proc. I Intern. Symp. Nitrogen Fixat.* / Ed. W.E. Newton, C.J. Nyman. – Washington State University Press, Pullman. – 1976. – P. 518-538.
120. Döbereiner, J. Bases científicas para uma agricultura biológica / J. Döbereiner, J.I. Baldani // *Ci. Cul.* – 1982. – Vol. 34, No. 7. – P. 869-881.
121. Dos Santos Ferreira, N. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov / N. Dos Santos Ferreira, F. Hayashi Sant' Anna, V. Massena Reis, A. Ambrosini, C. Gazolla Volpiano, M. Rothballer, S. Schwab, V.A. Baura, E. Balsanelli, F.O. Pedrosa, L.M. Pereira Passaglia, E. Maltempi de Souza, A. Hartmann, F. Cassan, J.E. Zilli // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – Vol. 70, No. 12. – P. 6203-6212.
122. Dos Santos Lima Fagotti, D. Quorum sensing communication: *Bradyrhizobium-Azospirillum* interaction via N-acyl-homoserine lactones in the

promotion of soybean symbiosis / D. Dos Santos Lima Fagotti, J.L.F. Abrantes, P. Cerezini, J. Fukami, M.A. Nogueira, P. Del Cerro, R. Valderrama-Fernández, F.J. Ollero, M. Megías, M. Hungria // *J. Basic Microbiol.* – 2019. – Vol. 59, No. 1. – P. 38-53.

123. DuBois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. DuBois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith // *Anal. Chem.* – 1956. – Vol. 28, No. 3. – P. 350-356.

124. Dufrêne, Y.F. Surface composition, surface properties, and adhesiveness of *Azospirillum brasilense* – variation during growth / Y.F. Dufrêne, P.G. Rouxhet // *Can. J. Microbiol.* – 1996. – Vol. 42, No. 6. – P. 548-556.

125. Eckert, B. *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus* / B. Eckert, O.B. Weber, G. Kirchhof, A. Halbritter, M. Stoffels, A. Hartmann // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 51, No. 1. – P. 17-26.

126. Edwards, A.N. Characterization of cell surface and extracellular matrix remodeling of *Azospirillum brasilense* chemotaxis-like 1 signal transduction pathway mutants by atomic force microscopy / A.N. Edwards, P. Siuti, A.N. Bible, G. Alexandre, S.T. Retterer, M.J. Doktycz, J.L. Morrell-Falvey // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2011. – Vol. 314, No. 2. – P. 131-139.

127. Fallik, E. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum* / E. Fallik, S. Sarig, Y. Okon // *Azospirillum-Plant Associations* / Ed. Y. Okon. – CRC Press, Boca Raton. – 1994. – P. 77-85.

128. Fedonenko, Yu.P. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 / Yu.P. Fedonenko, G.V. Zatonsky, S.A. Konnova, E.L. Zdrovenko, V.V. Ignatov // *Carbohydr. Res.* – 2002. – Vol. 337, No. 9. – P. 869-872.

129. Fedonenko, Yu.P. Structure of the O-polysaccharide from the *Azospirillum lipoferum* Sp59b lipopolysaccharide / Yu.P. Fedonenko, O.N. Konnova, G.V. Zatonsky, S.A. Konnova, N.A. Kocharova, E.L. Zdrovenko, V.V. Ignatov // *Carbohydr. Res.* – 2005. – Vol. 340, No. 6. – P. 1259-1263.

130. Fedonenko, Yu.P. Immunochemical characterization of the capsular polysaccharide of *Azospirillum irakense* KBC1 / Yu.P. Fedonenko, G.L. Burygin, I.A.

Popova, E.N. Sigida, A.K. Surkina, E.L. Zdorovenko, S.A. Konnova // *Curr. Microbiol.* – 2013. – Vol. 67, No. 2. – P. 234-239.

131. Fernández, N. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor / N. Fernández, E.E. Díaz, R. Amils, J.L. Sanz // *Microb. Ecol.* – 2008. – Vol. 56, No. 1. – P. 121-132.

132. Fibach-Paldi, S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 326, No. 2. – P. 99-108.

133. Fischer, S. Colonization of wheat by *Azospirillum brasilense* Cd is impaired by saline stress / S. Fischer, V. Rivarola, G. Mori // *Plant Soil.* – 2000. – Vol. 225, No. 1-2. – P. 187-191.

134. Fischer, S.E. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress / S.E. Fischer, M.J. Miguel, G.B. Mori // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2003. – Vol. 219, No. 1. – P. 53-62.

135. Flemming, H.-C. The biofilm matrix / H.-C. Flemming, J. Wingender // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – Vol. 8, No. 9. – P. 623-633.

136. Friedman, L. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms / L. Friedman, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 51, No. 3. – P. 675-690.

137. Fukami, J. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth / J. Fukami, F.J. Ollero, M. Megías, M. Hungria // *AMB Express.* – 2017. – Vol. 7, No. 1. – P. 153 (1-13).

138. Fukami, J. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation / J. Fukami, P. Cerezini, M. Hungria // *AMB Express.* – 2018a. – Vol. 8, No. 1. – P. 73 (1-12).

139. Fukami, J. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress / J. Fukami, C. de la Osa, F.J. Ollero, M. Megías, M. Hungria // *Funct. Plant Biol.* – 2018b. – Vol. 45, No. 3. – P. 328-339.

140. Fukami, J. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 / J. Fukami, J.L.F. Abrantes, P. Del Cerro, M.A. Nogueira, F.J. Ollero, M. Megías, M. Hungria // Arch. Microbiol. – 2018c. – Vol. 200, No. 1. – P. 47-56.
141. Galindo Blaha, C.A. An *Azospirillum brasilense* Tn5 mutant with modified stress response and impaired in flocculation / C.A. Galindo Blaha, I.S. Schrank // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2003. – Vol. 83, No. 1. – P. 35-43.
142. Gao, P. Microbial diversity and abundance in the Xinjiang Luliang long-term water-flooding petroleum reservoir / P. Gao, H. Tian, G. Li, H. Sun, T. Ma // Microbiologyopen. – 2015. – Vol. 4, No. 2. – P. 332-342.
143. García, J.E. *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress / J.E. García, G. Maroniche, C. Creus, R. Suárez-Rodríguez, J.A. Ramirez-Trujillo, M.D. Groppa // Microbiol. Res. – 2017. – Vol. 202. – P. 21-29.
144. Gond, S.K. Effect of bacterial endophyte on expression of defense genes in Indian popcorn against *Fusarium moniliforme* / S.K. Gond, M.S. Bergen, M.S. Torres, J.F. White Jr, R.N. Kharwar // Symbiosis. – 2015. – Vol. 66, No. 3. – P. 133-140.
145. Gough, J. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure / J. Gough, K. Karplus, R. Hughey, C. Chothia // J. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 313, No. 4. – P. 903-919.
146. Granér, G. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum* / G. Granér, P. Persson, J. Meijer, S. Alström // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – Vol. 224, No. 2. – P. 269-276.
147. Haahtela, K. Nitrogenase activity (acetylene reduction) of root-associated, cold-climate *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Pseudomonas* species during growth on various carbon sources and at various partial pressures of oxygen / K. Haahtela, K. Kari, V. Sundman // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – Vol. 45, No. 2. – P. 563-570.
148. Haegi, A. *Azospirillum*-plant interaction: a biochemical approach / A. Haegi, M. Del Gallo // Nitrogen fixation (proceedings of the Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes) / Eds. M. Polsinelli, R. Materassi,

M. Vincenzini. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. – 1991. – Vol. 48 (book series ‘Developments in Plant and Soil Sciences’). – P. 147-153.

149. Halsall, D.M. Straw and xylan utilization by pure cultures of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. / D.M. Halsall, G.L. Turner, A.H. Gibson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – Vol. 49, No. 2. – P. 423-428.

150. Hartmann, A. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. / A. Hartmann, H.A. Fu, R.H. Burris // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54, No. 1. – P. 87-93.

151. Heidari, M. Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.) / M. Heidari, A. Golpayegani // *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* – 2012. – Vol. 11, No. 1. – P. 57-61.

152. Herschkovitz, Y. *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*) / Y. Herschkovitz, A. Lerner, Y. Davidov, Y. Okon, E. Jurkevitch // *Environ. Microbiol.* – 2005 – Vol. 7, No. 11. – P. 1847-1852.

153. Hitchcock, P.J. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels / P.J. Hitchcock, T.M. Brown // *J. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 154, No. 1. – P. 269-277.

154. Holst, O. The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides – an update / O. Holst // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – Vol. 271, No. 1. – P. 3-11.

155. Hong, H. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel / H. Hong, D.R. Patel, L.K. Tamm, B. van den Berg // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, No. 11. – P. 7568-7577.

156. Hou, X. Cellular responses during morphological transformation in *Azospirillum brasilense* and its *flcA* knockout mutant / X. Hou, M. McMillan, J.V.F. Coumans, A. Poljak, M.J. Raftery, L. Pereg // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No. 12. – P. e114435 (1-25).

157. Huergo, L.F. *In vitro* interactions between the PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*

/ L.F. Huergo, M. Merrick, R.A. Monteiro, L.S. Chubatsu, M.B. Steffens, F.O. Pedrosa, E.M. Souza // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, No. 11. – P. 6674-6682.

158. Hungria, M. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability / M. Hungria, M.A. Nogueira, R.S. Araujo // Am. J. Plant Sci. – 2015. – Vol. 6, No. 6. – P. 811-817.

159. Jijón-Moreno, S. TyrR is involved in the transcriptional regulation of biofilm formation and D-alanine catabolism in *Azospirillum brasilense* Sp7 / S. Jijón-Moreno, B.E. Baca, D.C. Castro-Fernández, A. Ramírez-Mata // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, No. 2. – P. e0211904 (1-21).

160. Joe, M. Optimization of biofloc production in *Azospirillum brasilense* (MTCC-125) and evaluation of its adherence with the roots of certain crops / M. Joe, M.B. Karthikeyan, C. Sekar, M. Deiveekasundaram // Indian J. Microbiol. – 2010. – Vol. 50, Sup. 1. – P. S21-S25.

161. Joe, M.M. Development of alginate-based aggregate inoculants of *Methylobacterium* sp. and *Azospirillum brasilense* tested under *in vitro* conditions to promote plant growth / M.M. Joe, V.S. Saravanan, M.R. Islam, T. Sa // J. Appl. Microbiol. – 2014. – Vol. 116, No. 2. – P. 408-423.

162. Jofré, E. Differential gene expression in *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress / E. Jofré, V. Rivarola, H. Balegno, G. Mori // Can. J. Microbiol. – 1998. – Vol. 44, No. 10. – P. 929-936.

163. Jofré, E. Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense* / E. Jofré, A. Lagares, G. Mori // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 231, No. 2. – P. 267-275.

164. Jofré, E. Mutation in a D-alanine-D-alanine ligase of *Azospirillum brasilense* Cd results in an overproduction of exopolysaccharides and a decreased tolerance to saline stress / E. Jofré, S. Fischer, A. Príncipe, M. Castro, W. Ferrari, A. Lagares, G. Mori // FEMS Microbiol. Lett. – 2009. – Vol. 290, No. 2. – P. 236-246.

165. Kamilova, F. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria /

F. Kamilova, L.V. Kravchenko, A.I. Shaposhnikov, T. Azarova, N. Makarova, B. Lugtenberg // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2006. – Vol. 19, No. 3. – P. 250-256.

166. Kannenberg, E.L. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development / E.L. Kannenberg, R.W. Carlson // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39, No. 2. – P. 379-391.

167. Kapulnik, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation / Y. Kapulnik, Y. Okon, Y. Henis // *Can. J. Microbiol.* – 1985. – Vol. 31. – P. 881-887.

168. Karkhanis, Y.D. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria / Y.D. Karkhanis, J.Y. Zeltner, J.J. Jackson, D.J. Carlo // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol. 85, No. 2. – P. 595-601.

169. Karpati, E. Interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin stimulates nitrogen fixation / E. Karpati, P. Kiss, T. Ponyi, I. Fendrik, M. de Zamaroczy, L. Orosz // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, No. 13. – P. 3949-3955.

170. Karpunina, L.V. Involvement of agglutinative proteins from *Bacillus* and *Rhizobium* in interbacterial interactions / L.V. Karpunina, U.Yu. Mel'nikova, S.A. Konnova // *Infect. Dis. Rev.* – 2001. – Sup. 3. – P. 116-123.

171. Karpunina, L.V. Biological role of lectins from the nitrogen-fixing *Paenibacillus polymyxa* strain 1460 during bacterial-plant-root interactions / L.V. Karpunina, U.Yu. Mel'nikova, S.A. Konnova // *Curr. Microbiol.* – 2003. – Vol. 47, No. 5. – P. 376-378.

172. Katupitiya, S. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat / S. Katupitiya, J. Millet, M. Vesk, L. Viccars, A. Zeman, Z. Lidong, C. Elmerich, I.R. Kennedy // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61, No. 5. – P. 1987-1995.

173. Kauffmann, S. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-beta-glucanase activity / S. Kauffmann, M. Legrand, P. Geoffroy, B. Fritig // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6, No. 11. – P. 3209-3212.

174. Kelley, L.A. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis / L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J.E. Sternberg // *Nat. Protoc.* – 2015. – Vol. 10, No. 6. – P. 845-858.

175. Khalid, M. Mitigation of salt stress in white clover (*Trifolium repens*) by *Azospirillum brasilense* and its inoculation effect / M. Khalid, M. Bilal, D. Hassani, H.M.N. Iqbal, H. Wang, D. Huang // Bot. Stud. – 2017. – Vol. 58, No. 1. – P. 5 (1-7).
176. Kim, K. Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants / K. Kim, Y.-J. Jang, S.-M. Lee, B.-T. Oh, J.-C. Chae, K.-J. Lee // Mol. Cells. – 2014. – Vol. 37, No. 2. – P. 109-117.
177. Kirchhof, G. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes / G. Kirchhof, M. Schloter, B. Assmus, A. Hartmann // Soil Biol. Biochem. – 1997. – Vol. 29. – 853-862.
178. Konnova, S.A. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions / S.A. Konnova, O.E. Makarov, I.M. Skvortsov, V.V. Ignatov // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – Vol. 118. – P. 93-99.
179. Konnova, S.A. The chemical composition and functions of *Azospirillum* extracellular polysaccharidic complexes / S.A. Konnova, V.V. Ignatov // Biology of plant-microbe interactions. Volume 4. Molecular plant-microbe interactions: new bridges between past and future (proceedings of the 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions) / Eds. I. Tikhonovich, B. Lugtenberg, N. Provorov. – St.-Petersburg, Russia. – 2003. – P. 327-331.
180. Kosolapova, A.O. Two novel amyloid proteins, RopA and RopB, from the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* / A.O. Kosolapova, M.V. Belousov, A.I. Sulatskaya, M.E. Belousova, M.I. Sulatsky, K.S. Antonets, K.V. Volkov, A.N. Lykholay, O.Y. Shtark, E.N. Vasileva, V.A. Zhukov, A.N. Ivanova, P.A. Zykin, I.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, I.A. Tikhonovich, A.A. Nizhnikov // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9, No. 11. – P. 694 (1-24).
181. Lavrinenko, K. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring / K. Lavrinenko, E. Chernousova, E. Gridneva, G. Dubinina, V. Akimov, J. Kuever, A. Lysenko, M. Grabovich // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2010. – Vol. 60, No. 12. – P. 2832-2837.
182. Leive, L. Physical, chemical, and immunological properties of lipopolysaccharide released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate / L.

Leive, V.K. Shovlin, S.E. Mergenhagen // *J. Biol. Chem.* – 1968. – Vol. 243, No. 24. – P. 6384-6391.

183. Leontein, K. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols / K. Leontein, B. Lindberg, J. Lönngren // *Carbohydr. Res.* – 1978. – Vol. 62, No. 2. – P. 359-362.

184. Lerner, A. Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7 / A. Lerner, S. Castro-Sowinski, H. Lerner, Y. Okon, S. Burdman // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009a. – Vol. 300, No. 1. – P. 75-82.

185. Lerner, A. The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis / A. Lerner, S. Castro-Sowinski, A. Valverde, H. Lerner, R. Dror, Y. Okon, S. Burdman // *Microbiology.* – 2009b. – Vol. 155, No. 12. – P. 4058-4068.

186. Lerner, A. The *wzm* gene located on the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp7 is involved in lipopolysaccharide synthesis / A. Lerner, Y. Okon, S. Burdman // *Microbiology.* – 2009c. – Vol. 155, No. 3. – P.791-804.

187. Lerner, A. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation / A. Lerner, A. Valverde, S. Castro-Sowinski, H. Lerner, Y. Okon, S. Burdman // *Environ. Microbiol. Rep.* – 2010. – Vol. 2, No. 4. – P. 577-586.

188. Lim, J.-H. Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper / J.-H. Lim, S.-D. Kim // *Plant Pathol. J.* – 2013. – Vol. 29, No. 2. – P. 201-208.

189. Lin, W. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense* / W. Lin, Y. Okon, R.W.F. Hardy // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1983. – Vol. 45, No. 6. – P. 1775-1779.

190. Lin, S.-Y. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar / S.-Y. Lin, C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, A.B. Arun, W.-M. Chen, W.-A. Lai, F.-T. Shen, P.D. Rekha, A.F. Yassin // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2009. – Vol. 59, No. 4. –P. 761-765.

191. Lin, S.-Y. *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil / S.-Y. Lin, F.-T. Shen, L.-S. Young, Z.-L. Zhu, W.-M. Chen, C.-C. Young // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – Vol. 62, No. 5. – P. 1185-1190.

192. Lin, S.-Y. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter / S.-Y. Lin, Y.-C. Liu, A. Hameed, Y.-H. Hsu, W.-A. Lai, F.-T. Shen, C.-C. Young // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – Vol. 63, No. 10. – P. 3762-3768.
193. Lin, S.-Y. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil / S.-Y. Lin, A. Hameed, Y.-C. Liu, Y.-H. Hsu, W.-A. Lai, F.-T. Shen, C.-C. Young // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2015. – Vol. 65, No. 12. – P. 4601-4607.
194. Lin, S.-Y. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil / S.-Y. Lin, Y.-C. Liu, A. Hameed, Y.-H. Hsu, H.-I. Huang, W.-A. Lai, C.-C. Young // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – Vol. 66, No. 3. –P. 1453-1458.
195. Lindahl, M. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells / M. Lindahl, A. Faris, T. Wadström, S. Hjertén // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 677, No. 3-4. – P. 471-476.
196. Lopes, M.S. Enhancing drought tolerance in C4 crops / M.S. Lopes, J.L. Araus, P.D.R. van Heerden, C.H. Foyer // *J. Exp. Bot.* – 2011. – Vol. 62, No. 9. – P. 3135-3153.
197. Madi, L. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion / L. Madi, Y. Henis // *Plant Soil.* – 1989. – Vol. 115, No. 1. – P. 89-98.
198. Madkour, M.A. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria / M.A. Madkour, L.T. Smith, G.M. Smith // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56, No. 9. – P. 2876-2881.
199. Martinez-Drets, G. Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by azospirilla / G. Martinez-Drets, M. Del Gallo, C. Burpee, R.H. Burris // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol. 159, No. 1. – P. 80-85.
200. Martínez-Hidalgo, P. Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial, environmentally safe bacteria / P. Martínez-Hidalgo, M. Maymon, F. Pule-Meulenberg, A.M. Hirsch // *Can. J. Microbiol.* – 2019. – Vol. 65, No. 2. – P. 91-104.

201. Mayer, H. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria / H. Mayer, R.N. Tharanathan, J. Weckesser // *Methods Microbiol.* – 1985. – Vol. 18. – P. 157-207.
202. Mehnaz, S. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere / S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007a. – Vol. 57, No. 3. – P. 620-624.
203. Mehnaz, S. *Azospirillum zea* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays* / S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007b. – Vol. 57, No. 12. – P. 2805-2809.
204. Merino, S. Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34 / S. Merino, S. Camprubí, J.M. Tomás // *Infect. Immun.* – 1992. – Vol. 60, No. 10. – P. 4343-4349.
205. Michiels, K. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation / K. Michiels, C. Verreth, J. Vanderleyden // *J. Appl. Bacteriol.* – 1990. – Vol. 69. – P. 705-711.
206. Michiels, K.W. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots / K.W. Michiels, C.L. Croes, J. Vanderleyden // *J. Gen. Microbiol.* – 1991. – Vol. 137, No. 9. – P. 2241-2246.
207. Miller, K.J. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria / K.J. Miller, J.M. Wood // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1996. – Vol. 50. – P. 101-136.
208. Mishra, M.N. Mutation in a gene encoding anti- σ factor in *A. brasilense* confers tolerance to elevated temperature, antibacterial peptide and PEG-200 via carotenoid synthesis / M.N. Mishra, N. Thirunavukkarasu, I.M. Sharma, M.V. Jagannadham, A.K. Tripathi // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2008. – Vol. 287, No. 2. – P. 221-229.
209. Mishra, M.N. An extracytoplasmic function sigma factor cotranscribed with its cognate anti-sigma factor confers tolerance to NaCl, ethanol and methylene blue in *Azospirillum brasilense* Sp7 / M.N. Mishra, S. Kumar, N. Gupta, S. Kaur, A. Gupta, A.K. Tripathi // *Microbiology.* – 2011. – Vol. 157, No. 4. – P. 988-999.
210. Mitchell, A.L. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations / A.L. Mitchell, T.K. Attwood, P.C. Babbitt, M. Blum, P. Bork, A. Bridge, S.D. Brown, H.-Y. Chang, S. El-Gebali, M.I. Fraser, J. Gough,

D.R. Haft, H. Huang, I. Letunic, R. Lopez, A. Luciani, F. Madeira, A. Marchler-Bauer, H. Mi, D.A. Natale, M. Necci, G. Nuka, C. Orengo, A.P. Pandurangan, T. Paysan-Lafosse, S. Pesseat, S.C. Potter, M.A. Qureshi, N.D. Rawlings, N. Redaschi, L.J. Richardson, C. Rivoire, G.A. Salazar, A. Sangrador-Vegas, C.J.A. Sigrist, I. Sillitoe, G.G. Sutton, N. Thanki, P.D. Thomas, S.C.E. Tosatto, S.-Y. Yong, R.D. Finn // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, No. D1. – P. D351-D360.

211. Moens, S. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *lafI*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7 / S. Moens, K. Michiels, V. Keijers, F. Van Leuven, J. Vanderleyden // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177, No. 19. – P. 5419-5426.

212. Moens, S. Expression of the structural gene, *lafI*, encoding the flagellin of the lateral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7 / S. Moens, M. Schloter, J. Vanderleyden // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178, No. 16. – P. 5017-5019.

213. Montes García, J.F. *Mannheimia haemolytica* OmpP2-like is an amyloid-like protein, forms filaments, takes part in cell adhesion and is part of biofilms / J.F. Montes García, S. Vaca, N.L. Delgado, A. Uribe-García, C. Vázquez, P. Sánchez Alonso, J. Xicohtencatl Cortes, A. Cruz Cordoba, E. Negrete Abascal // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2018. – Vol. 111, No. 12. – P. 2311-2321.

214. Mora, P. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium / P. Mora, F. Rosconi, L. Franco Fraguas, S. Castro-Sowinski // *Arch. Microbiol.* – 2008. – Vol. 189, No. 5. – P. 519-524.

215. Mukherjee, T. *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters / T. Mukherjee, D. Kumar, N. Burriss, Z. Xie, G. Alexandre // *J. Bacteriol.* – 2016. – Vol. 198, No. 12. – P. 1764-1772.

216. Müller-Seitz, E. Degradation studies on the lipopolysaccharide from *E. coli* 071:K?:H12. Separation and investigation of O-specific and core polysaccharides / E. Müller-Seitz, B. Jann, K. Jann // *FEBS Lett.* – 1968. – Vol. 1, No. 5. – P. 311-314.

217. Myers, M.L. Plant cell wall carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasilense* / M.L. Myers, D.H. Hubbell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1987. – Vol. 53, No. 12. – P. 2745-2748.

218. Nabti, E. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca* / E. Nabti, M. Sahnoune, M. Ghoul, D. Fischer, A. Hofmann, M. Rothballer, M. Schimid, A. Hartmann // *J. Plant Growth Regul.* – 2010. – Vol. 29, No. 1. – P. 6-22.
219. Nagarajan, T. Identification of salt stress inducible genes that control cell envelope related functions in *Azospirillum brasilense* Sp7 / T. Nagarajan, J. Vanderleyden, A.K Tripathi // *Mol. Genet. Genomics.* – 2007. – Vol. 278, No. 1. – P. 43-51.
220. Nandal, K. High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* sp. (*Cajanus*) / K. Nandal, A.R. Sehrawat, A.S. Yadav, R.K. Vashishat, K.S. Boora // *Microbiol. Res.* – 2005. – Vol. 160, No. 4. – P. 367-373.
221. Nizhnikov, A.A. Prions, amyloids, and RNA: Pieces of a puzzle / A.A. Nizhnikov, K.S. Antonets, S.A. Bondarev, S.G. Inge-Vechtomov, I.L. Derkatch // *Prion.* – 2016. – Vol. 10, No. 3. – P. 182-206.
222. Okon, Y. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum* / Y. Okon, S.L. Albrecht, R.H. Burris // *J. Bacteriol.* – 1976. – Vol. 127, No. 3. – P. 1248-1254.
223. Okon, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture / Y. Okon // *Trends Biotechnol.* – 1985. – Vol. 3, No. 9. – P. 223-228.
224. Okon, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots / Y. Okon, Y. Kapulnik // *Plant Soil.* – 1986. – Vol. 90, No. 1-3. – P. 3-16.
225. Okon, Y. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation / Y. Okon, C.A. Labandera-Gonzalez // *Soil Biol. Biochem.* – 1994. – Vol. 26, No. 12. – P. 1591-1601.
226. Pagnussat, L.A. Interspecific cooperation: enhanced growth, attachment and strain-specific distribution in biofilms through *Azospirillum brasilense*-*Pseudomonas protegens* co-cultivation / L.A. Pagnussat, F. Salcedo, G. Maroniche, C. Keel, C. Valverde, C.M. Creus // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2016. – Vol. 363, No. 20. – P. fnw238 (1-9).

227. Pedrosa, F.O. Regulation of nitrogen fixation and ammonium assimilation in associative and endophytic nitrogen fixing bacteria / F.O. Pedrosa, C. Elmerich // Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations / Eds. C. Elmerich, W.E. Newton. – Springer, Dordrecht. – 2007. – P. 41-71.
228. Peng, G. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass / G. Peng, H. Wang, G. Zhang, W. Hou, Y. Liu, E.T. Wang, Z. Tan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56, No. 6. – P. 1263-1271.
229. Pereg, L. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants / L. Pereg, L.E. de-Bashan, Y. Bashan // Plant Soil. – 2016. – Vol. 399, No. 1-2. – P. 389-414.
230. Pereg-Gerk, L. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7 / L. Pereg-Gerk, A. Paquelin, P. Gounon, I.R. Kennedy, C. Elmerich // Mol. Plant Microbe Interact. – 1998. – Vol. 11, No. 3. – P.177-187.
231. Pereg-Gerk, L. Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense*-wheat associations / L. Pereg-Gerk, K. Gilchrist, I.R. Kennedy // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, No. 5. – P. 2175-2184.
232. Perrig, D. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation / D. Perrig, M.L. Boiero, O.A. Masciarelli, C. Penna, O.A. Ruiz, F.D. Cassán, M.V. Luna // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol.75, No. 5. – P. 1143-1150.
233. Pettersen, E.F. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin // J. Comput. Chem. – 2004. – Vol. 25, No. 13. – P. 1605-1612.
234. Plazinski, J. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens* / J. Plazinski, B.G. Rolfe // J. Plant Physiol. – 1985. – Vol. 120, No. 2. – P. 181-187.
235. Ramírez-Mata, A. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* / A.

Ramírez-Mata, L.I. López-Lara, M.L. Xiqui-Vázquez, S. Jijón-Moreno, A. Romero-Osorio, B.E. Baca // Res. Microbiol. – 2016. – Vol. 167, No. 3. – P. 190-201.

236. Ramírez-Mata, A. Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with *egfp* and *mCherry* genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots / A. Ramírez-Mata, M.R. Pacheco, S.J. Moreno, M.L. Xiqui-Vazquez, B.E. Baca // Microbiol. Res. – 2018. – Vol. 215. – P. 155-163.

237. Reinhold, B. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) / B. Reinhold, T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, J. De Ley // Inter. J. Syst. Bacteriol. – 1987. – Vol. 37, No. 1. – P. 43-51.

238. Riou, N. Osmoregulation in *Azospirillum brasilense*: glycine betaine transport enhances growth and nitrogen fixation under salt stress / N. Riou, D. Le Rudulier // J. Gen. Microbiol. – 1990. – Vol. 136, No. 8. – P. 1455-1461.

239. Riou, N. Characterization of an osmoregulated periplasmic glycine betaine-binding protein in *Azospirillum brasilense* Sp7 / N. Riou, M.C. Poggi, D. Le Rudulier // Biochimie. – 1991. – Vol. 73, No. 9. – P. 1187-1193.

240. Rivarola, V. Response of *Azospirillum brasilense* Cd to sodium chloride stress / V. Rivarola, S. Castro, G. Mori, E. Jofré, A. Fabra, R. Garnica, H. Balegno // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1998. – Vol. 73, No. 3. – P. 255-261.

241. Rocque, W.J. Polycation binding to isolated lipopolysaccharide from antibiotic-hypersusceptible mutant strains of *Escherichia coli* / W.J. Rocque, S.W. Fesik, A. Haug, E.J. McGroarty // Antimicrob. Agents Chemother. – 1988. – Vol. 32, No. 3. – P. 308-313.

242. Rodelas, B. Production of vitamins by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined media / B. Rodelas, V. Salmeron, M.V. Martinez-Toledo, J. González-López // Plant Soil. – 1993. – Vol. 153, No.1. – P. 97-101.

243. Rodríguez-Navarro, D.N. Attachment of bacteria to the roots of higher plants / D.N. Rodríguez-Navarro, M.S. Dardanelli, J.E. Ruíz-Saínz // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 272, No. 2. – P. 127-136.

244. Rottem, S. Thermal regulation of the fatty acid composition of lipopolysaccharides and phospholipids of *Proteus mirabilis* / S. Rottem, O. Markowitz, S. Razin // Eur. J. Biochem. – 1978. – Vol. 85, No. 2. – P. 445-450.

245. Ryder, C. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / C. Ryder, M. Byrd, D.J. Wozniak // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 10, No. 6. – P. 644-648.
246. Sadasivan, L. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation / L. Sadasivan, C.A. Neyra // *J. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 163, No. 2. – P. 716-723.
247. Saeed, M. Drought mitigation potential of *Azospirillum* inoculation in canola (*Brassica napus*) / M. Saeed, N. Ilyas, R. Mazhar, F. Bibi, N. Batool // *J. Appl. Bot. Food Qual.* – 2016. – Vol. 89. – P. 270-278.
248. Sahaya Rajan, J.J. Outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* induces neurodegeneration in mice by acting as an amyloid / J.J. Sahaya Rajan, T. Chinnappan Santiago, R. Singaravel, S. Ignacimuthu // *Biotechnol. Lett.* – 2016. – Vol. 38, No. 4. – P. 689-700.
249. Sahoo, R.K. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity / R.K. Sahoo, M.W. Ansari, M. Pradhan, T.K. Dangar, S. Mohanty, N. Tuteja // *Protoplasma.* – 2014. – Vol. 251, No. 4. – P. 943-953.
250. Saikia, S.P. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops / S.P. Saikia, D. Bora, A. Goswami, K.D. Mudoi, A. Gogoi // *Afr. J. Microbiol. Res.* – 2012. – Vol. 6, No. 6. – P. 1085-1102.
251. Santos, M.S. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture / M.S. Santos, M.A. Nogueira, M. Hungria // *AMB Express.* – 2019. – Vol. 9, No. 1. – P. 205 (1-22).
252. Sarig, S. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense* / S. Sarig, A. Blum, Y. Okon // *J. Agric. Sci.* – 1988. – Vol. 110, No. 2. – P. 271-277.
253. Sarma, R.K. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21 / R.K. Sarma, R. Saikia // *Plant Soil.* – 2014. – Vol. 377, No. 1-2. – P. 111-126.

254. Sawardeker, J.S. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography / J.S. Sawardeker, J.H. Sloneker, A. Jeanes // *Anal. Chem.* – 1965. – Vol. 37, No. 12. – P. 1602-1604.

255. Saxena, B. Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2 / B. Saxena, M. Modi, V.V. Modi // *J. Gen. Microbiol.* – 1986. – Vol. 132. – P. 2219-2224.

256. Schilling, B. Site-specific acylation changes in the lipid A of *Escherichia coli* *lpxL* mutants grown at high temperatures / B. Schilling, J. Hunt, B.W. Gibson, M.A. Apicella // *Innate Immun.* – 2014. – Vol. 20, No. 3. – P. 269-282.

257. Schromm, A.B. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion / A.B. Schromm, K. Brandenburg, H. Loppnow, A.P. Moran, M.H.J. Koch, E.T. Rietschel, U. Seydel // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267, No. 7. – P.2008-2013.

258. Seydel, U. Structural studies on the lipid A component of enterobacterial lipopolysaccharides by laser desorption mass spectrometry. Location of acyl groups at the lipid A backbone / U. Seydel, B. Lindner, H.-W. Wollenweber, E.T. Rietschel // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – Vol. 145, No. 3. – P. 505-509.

259. Shatsky, M. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures / M. Shatsky, R. Nussinov, H.J. Wolfson // *Proteins.* – 2004. – Vol. 56, No. 1. – P. 143-156.

260. Shelud'ko, A.V. Restoration of polar-flagellum motility and biofilm-forming capacity in the *mmsB1* mutant of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 points to a new role for a homologue of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase / A.V. Shelud'ko, Yu.A. Filip'echeva, E.M. Telesheva, S.S. Yevstigneyeva, L.P. Petrova, E.I. Katsy // *Can. J. Microbiol.* – 2019. – Vol. 65, No. 2. – P. 144-154.

261. Sigida, E.N. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 / E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, A.S. Shashkov, E.L. Zdrovenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov, Yu.A. Knirel // *Carbohydr. Res.* – 2013. – Vol. 380. – P. 76-80.

262. Sigida, E.N. Structural studies of the polysaccharides from the lipopolysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp246 and SpBr14 / E.N. Sigida, Yu.P.

Fedonenko, A.S. Shashkov, V.S. Grinev, E.L. Zdrovenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov, Yu.A. Knirel // *Carbohydr. Res.* – 2014. – Vol. 398. – P. 40-44.

263. Sigida, E.N. Structure of the polysaccharides from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Jm125A2 / E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, A.S. Shashkov, E.L. Zdrovenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov, Yu.A. Knirel // *Carbohydr. Res.* – 2015. – Vol. 416. – P. 37-40.

264. Sigida, E.N. Elucidation of a masked repeating structure of the O-specific polysaccharide of the halotolerant soil bacteria *Azospirillum halopraeferens* Au4 / E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, A.S. Shashkov, N.P. Arbatsky, E.L. Zdrovenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov, Yu.A. Knirel // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2016. – Vol. 12. – P. 636-642.

265. Sigida, E.N. Structure of the O-specific polysaccharide of *Azospirillum doebereineriae* type strain GSF71^T / E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, A.S. Shashkov, E.L. Zdrovenko, S.A. Konnova, Yu.A. Knirel // *Carbohydr. Res.* – 2019. – Vol. 478. – P. 54-57.

266. Sillitoe, I. CATH: comprehensive structural and functional annotations for genome sequences / I. Sillitoe, T.E. Lewis, A. Cuff, S. Das, P. Ashford, N.L. Dawson, N. Furnham, R.A. Laskowski, D. Lee, J.G. Lees, S. Lehtinen, R.A. Studer, J. Thornton, C.A. Orengo // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43, No. D1. – P. D376-D381.

267. Siuti, P. The chemotaxis-like Che1 pathway has an indirect role in adhesive cell properties of *Azospirillum brasilense* / P. Siuti, C. Green, A.N. Edwards, M.J. Doktycz, G. Alexandre // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2011. – Vol. 323, No. 2. – P. 105-112.

268. Skerman, V.B.D. *Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters / V.B.D. Skerman, L.I. Sly, M.L. Williamson // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 33, No. 2. – P. 300-308.

269. Skvortsov, I. *Azospirillum brasilense* exopolysaccharide complexes, their possible involvement in bacteria-wheat roots interactions and the suggested nature of these interactions / I. Skvortsov, S. Konnova, O. Makarov, R. Prokhorova, V. Ignatov // *Azospirillum VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology* (proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on *Azospirillum VI* and Related Microorganisms) / Eds. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, M. Zamaroczy. – Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 1995. – Vol. G37. – P. 279-290.

270. Skvortsov, I.M. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots / I.M. Skvortsov, V.V. Ignatov // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – Vol. 165, No. 2. – P. 223-229.
271. Spaepen, S. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria / S. Spaepen, J. Vanderleyden, Y. Okon // Adv. Bot. Res. – 2009. – Vol. 51. – P. 283-320.
272. Spaepen, S. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense* / S. Spaepen, S. Bossuyt, K. Engelen, K. Marchal, J. Vanderleyden // New Phytol. – 2014. – Vol. 201, No. 3. – P. 850-861.
273. Spaepen, S. Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis / S. Spaepen, J. Vanderleyden // Biological nitrogen fixation / Ed. F.J. de Bruijn. – Wiley, Hoboken. – 2015. – P. 937-940.
274. Steenhoudt, O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects / O. Steenhoudt, J. Vanderleyden // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 24, No. 4. – P. 487-506.
275. Stephan, M.P. Physiological studies with *Azospirillum* spp. / M.P. Stephan, F.O. Pedrosa, J. Döbereiner // Associative N₂-fixation. Vol. 1. / Eds. P.B. Vose, A.P. Ruschel. – CRC Press, Boca Raton, Florida. – 1981. – P. 8-12.
276. Stephens, B.B. Role of CheB and CheR in the complex chemotactic and aerotactic pathway of *Azospirillum brasilense* / B.B. Stephens, S.N. Loar, G. Alexandre // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, No. 13. – P. 4759-4768.
277. Strzelczyk, E. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources / E. Strzelczyk, M. Kamper, C.Y. Li // Microbiol. Res. – 1994. – Vol. 149, No. 1. – P.55-60.
278. Tarrand, J.J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. / J.J. Tarrand, N.R. Krieg, J. Döbereiner // Can. J. Microbiol. – 1978. – Vol. 24, No. 8. – P. 967-980.
279. Tien, T.M. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) / T.M. Tien,

M.H. Gaskins, D.H. Hubbell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1979. – Vol. 37, No. 5. – P. 1016-1024.

280. Tien, T.M. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species / T.M. Tien, H.G. Diem, M.H. Gaskins, D.H. Hubbell // *Can. J. Microbiol.* – 1981. – Vol. 27, No. 4. – P. 426-431.

281. Tikhonova, E.N. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog / E.N. Tikhonova, D.S. Grouzdev, I.K. Kravchenko // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69, No. 9. – P. 2787-2793.

282. Tisdall, J.M. Organic matter and water-stable aggregates in soils / J.M. Tisdall, J.M. Oades // *Eur. J. Soil Sci.* – 1982. – Vol. 33, No. 2. – P. 141-163.

283. Thirunavukkarasu, N. An extra-cytoplasmic function sigma factor and anti-sigma factor control carotenoid biosynthesis in *Azospirillum brasilense* / N. Thirunavukkarasu, M.N. Mishra, S. Spaepen, J. Vanderleyden, C.A. Gross, A.K. Tripathi // *Microbiology.* – 2008. – Vol. 154, No. 7. – P. 2096-2105.

284. Thuler, D.S. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media / D.S. Thuler, E.I.S. Floh, W. Handro, H.R. Barbosa // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2003. – Vol. 37, No 2. – P.174-178.

285. Tortora, M.L. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* / M.L. Tortora, J.C. Díaz-Ricci, R.O. Pedraza // *Arch. Microbiol.* – 2011. – Vol. 193, No. 4. – P. 275-286.

286. Tripathi, A.K. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress / A.K. Tripathi, T. Nagarajan, S.C. Verma, D. Le Rudulier // *Curr. Microbiol.* – 2002. – Vol. 44, No. 5. – P. 363-367.

287. Tsai, C.-M. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels / C.-M. Tsai, C.E. Frasch // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 119, No. 1. – P. 115-119.

288. Turan, M. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey / M. Turan, M. Gulluce, N. von Wirén, F. Sahin // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* – 2012. – Vol. 175, No. 6. – P. 818-826.

289. Umali-Garcia, M. Association of *Azospirillum* with grass roots / M. Umali-Garcia, D.H. Hubbell, M.H. Gaskins, F.B. Dazzo // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1980. – Vol. 39, No. 1. – P. 219-226.

290. Valverde, A. cDNA-AFLP reveals differentially expressed genes related to cell aggregation of *Azospirillum brasilense* / A. Valverde, Y. Okon, S. Burdman // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – Vol. 265, No. 2. – P. 186-194.
291. van Loon, L.C. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins / L.C. van Loon, E.A. van Strien // Physiol. Mol. Plant Pathol. – 1999. – Vol. 55, No. 2. – P. 85-97.
292. Vande Broek, A. Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association / A. Vande Broek, J. Vanderleyden // Crit. Rev. Plant Sci. – 1995. – Vol. 14, No. 5. – P. 445-466.
293. Vejan, P. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review / P. Vejan, R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail, A. Nasrulhaq Boyce // Molecules. – 2016. – Vol. 21, No. 5. – P. 573 (1-17).
294. Von Bülow, J.F.W. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil / J.F.W. Von Bülow, J. Döbereiner // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1975. – Vol. 72, No. 6. – P. 2389-2393.
295. Wadhams, G.H. Making sense of it all: bacterial chemotaxis / G.H. Wadhams, J.P. Armitage // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2004. – Vol. 5, No. 12. – P. 1024-1037.
296. Wang, C.-J. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains / C.-J. Wang, W. Yang, C. Wang, C. Gu, D.-D. Niu, H.-X. Liu, Y.-P. Wang, J.-H. Guo // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, No. 12. – P. e52565 (1-10).
297. Wang, D. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions / D. Wang, A. Xu, C. Elmerich, L.Z. Ma // ISME J. – 2017. – Vol. 11, No. 7. – P. 1602-1613.
298. Watanabe, S. Characterization of a novel *cis*-3-hydroxy-L-proline dehydratase and a *trans*-3-hydroxy-L-proline dehydratase from bacteria / S. Watanabe, F. Fukumori, M. Miyazaki, S. Tagami, Y. Watanabe // J. Bacteriol. – 2017. – Vol. 199, No. 16. – P. e00255-17.
299. Westby, C.A. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense* / C.A. Westby, D.S. Cutshall, G.V. Vigil // J. Bacteriol. – 1983. – Vol. 156. – P. 1369-1372.

300. Wisniewski-Dyé, F. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments / F. Wisniewski-Dyé, K. Borziak, G. Khalsa-Moyers, G. Alexandre, L.O. Sukharnikov, K. Wuichet, G.B. Hurst, W.H. McDonald, J.S. Robertson, V. Barbe, A. Calteau, Z. Rouy, S. Mangenot, C. Prigent-Combaret, P. Normand, M. Boyer, P. Siguier, Y. Dessaux, C. Elmerich, G. Condemine, G. Krishnen, I. Kennedy, A.H. Paterson, V. González, P. Mavingui, I.B. Zhulin // *PLoS Genet.* – 2011. – Vol. 7, No. 12. – P. e1002430 (1-13).
301. Wollenweber, H.-W. Fatty acid in lipopolysaccharides of *Salmonella* species grown at low temperature. Identification and position / H.-W. Wollenweber, S. Schlecht, O. Lüderitz, E.T. Rietschel // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – Vol. 130, No. 1. – P.167-171.
302. Wu, S. LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction / S. Wu, Y. Zhang // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35, No. 10. – P. 3375-3382.
303. Wu, X.-B. Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis / X.-B. Wu, L.-H. Tian, H.-J. Zou, C.-Y. Wang, Z.-Q. Yu, C.-H. Tang, F.-K. Zhao, J.-Y. Pan // *Res. Microbiol.* – 2013. – Vol. 164, No. 8. – P. 848-855.
304. Wu, D. *Azospirillum oleiclasticum* sp. nov, a nitrogen-fixing and heavy oil degrading bacterium isolated from an oil production mixture of Yumen Oilfield / D. Wu, X.-J. Zhang, H.-C. Liu, Y.-G. Zhou, X.-L. Wu, Y. Nie, Y.-Q. Kang, M. Cai // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2021. – Vol. 44, No. 1. – P. 126171.
305. Xie, C.H. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* / C.H. Xie, A. Yokota // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55, No. 4. – P. 1435-1438.
306. Xu, D. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization / D. Xu, Y. Zhang // *Biophys. J.* – 2011. – Vol. 101, No. 10. – P. 2525-2534.
307. Yagoda-Shagam, J. Fluorescein isothiocyanate-labeled lectin analysis of the surface of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* by flow cytometry / J. Yagoda-Shagam, L.L. Barton, W.P. Reed, R. Chiovetti // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54, No. 7. – P. 1831-1837.

308. Yamashita, E. Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon / E. Yamashita, M.V. Zhalnina, S.D. Zakharov, O. Sharma, W.A. Cramer // EMBO J. – 2008. – Vol. 27, No. 15. – P. 2171-2180.
309. Yang, J. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction / J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, Y. Zhang // Nat. Methods. – 2015. – Vol. 12, No. 1. – P. 7-8.
310. Yang, Y. *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater / Y. Yang, R. Zhang, J. Feng, C. Wang, J. Chen // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2019. – Vol. 69, No. 12. – P. 3676-3681.
311. Yegorenkova, I.V. *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation / I.V. Yegorenkova, S.A. Konnova, V.N. Sachuk, V.V. Ignatov // Plant Soil. – 2001. – Vol. 231, No. 2. – P. 275-282.
312. Young, C.C. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil / C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, M.-J. Ho, A.B. Arun, W.-A. Lai, P.D. Rekha, F.-T. Shen, M.-H. Hung, W.-M. Chen, A.F. Yassin // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58, No. 4. – P. 959-963.
313. Zdrovenko, E.L. Structure of the O-specific polysaccharides from planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas chlororaphis* 449 / E.L. Zdrovenko, A.S. Shashkov, M.V. Zhurina, V.K. Plakunov, Yu.A. Knirel // Carbohydr. Res. – 2015. – Vol. 404. – P. 93-97.
314. Zhang, Q. Enhancement of fipronil degradation with eliminating its toxicity in a microbial fuel cell and the catabolic versatility of anodic biofilm / Q. Zhang, L. Zhang, Z. Li, L. Zhang, D. Li // Bioresour. Technol. – 2019. – Vol. 290. – P. 121723 (1-7).
315. Zhao, Z.-L. *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring / Z.-L. Zhao, H. Ming, C.-L. Ding, W.-L. Ji, L.-J. Cheng, M.-M. Niu, Y.-M. Zhang, L.-Y. Zhang, X.-L. Meng, G.-X. Nie // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2020. – Vol. 70, No. 1. – P. 550-554.
316. Zhou, Y. *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China / Y. Zhou, W. Wei, X. Wang, L. Xu, R. Lai // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 55, No. 1. – P. 1-7.

317. Zhou, S. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell / S. Zhou, L. Han, Y. Wang, G. Yang, L. Zhuang, P. Hu // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Vol. 63, No. 7. – P. 2618-2624.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и РИНЦ

1. Petrova, L.P. Plasmid gene for putative integral membrane protein affects formation of lipopolysaccharide and motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 / L.P. Petrova, **S.S. Yevstigneyeva**, Yu.A. Filip'echeva, A.V. Shelud'ko, G.L. Burygin, E.I. Katsy // Folia Microbiol. – 2020. – Vol. 65, No. 6. – P. 963-972. **IF=2.099, Q3.**

DOI: 10.1007/s12223-020-00805-5.

2. Petrova, L.P. Plasmid gene AZOBR_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 / L.P. Petrova, **S.S. Yevstigneyeva**, I.V. Borisov, A.V. Shelud'ko, G.L. Burygin, E.I. Katsy // J. Basic Microbiol. – 2020. – Vol. 60, No. 7. – P. 613-623. **IF=2.281, Q2.**

DOI: 10.1002/jobm.201900635.

3. **Евстигнеева, С.С.** Оптимизация условий получения флокулирующих культур бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 и моносахаридный состав их гликополимеров / **С.С. Евстигнеева**, Д.А. Рыбальченко, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Известия УНЦ РАН. – 2019. – №1. – С. 77-82.

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-77-82.

4. Шелудько, А.В. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьева, Е.М. Телешева, А.М. Буров, **С.С. Евстигнеева**, Г.Л. Бурьгин, Л.П. Петрова // Микробиология. – 2018. – Т. 87, №5. – С. 483-494. **IF=1.156, Q4.**

DOI: 10.1134/S0026365618050166.

5. **Евстигнеева, С.С.** Структурные особенности капсульных и О-полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 при изменении условий культивирования / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Микробиология. – 2016. – Т.85, №6. – С. 643-651. **IF=1.156, Q4.**

DOI: 10.7868/S0026365616060094.

6. Халэпа, Я.В. Характеристика структурных особенностей липополисахарид-белковых комплексов капсулы бактерий *Azospirillum brasilense* SR80 и Sp245 при росте на агаризованной среде / Я.В. Халэпа, С.С. Евстигнеева, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2014. – Т. 14, №3. – С. 50-54.

Публикации в других журналах и изданиях

7. Евстигнеева, С.С. Бактериальный «социум» биопленок или особенности организации микробных сообществ ризосферы / С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко // «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: Материалы конференции / IX Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 14-18 октября 2019 г. – Саратов: ООО «Издательский Центр Наука», 2019. – С. 27.

8. Евстигнеева, С.С. Матрикс биопленок бактерий рода *Azospirillum*: особенности выделения и характеристика основных компонентов / С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко, А.А. Широков // Acta Naturae, спецвыпуск: Сборник научных трудов, том 2 / II Объединенный научный форум: VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи, Дагомыс, 1-6 октября 2019 г. – М: Издательство «Перо», 2019. – С. 279.

9. Евстигнеева, С.С. Выжить любой ценой: флоккулы и биопленки как фактор резистентности почвенных бактерий / С.С. Евстигнеева, Ю.П. Федоненко // Фундаментальная гликобиология [Электронный ресурс]: сб. материалов IV Всерос. конф., Киров 23-28 сентября 2018 г. – Киров: Науч. изд-во ВятГУ, 2018. – С. 98-99.

10. Евстигнеева, С.С. Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий *Azospirillum halopraeferens* Au4 / С.С. Евстигнеева, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Уфа, 13-17 июня 2018 г. / отв. ред. И.А. Тихонович, 2018. – С. 143.

11. **Евстигнеева, С.С.** Структура липополисахарид-белкового комплекса капсулы *Azospirillum brasilense* Sp245 – фактора формирования ассоциации с растениями / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, В.С. Гринёв // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017»: Сборник тезисов, Казань, 25-28 октября 2017 г. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С. 84-86.
12. **Евстигнеева, С.С.** Вариабельность состава и структуры экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *Azospirillum brasilense* при солевом и температурном стрессах / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Материалы конференции / VIII Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 26-30 сентября 2016 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2016. – С. 50.
13. **Евстигнеева, С.С.** Характеристика гликанов клеточной поверхности и матрикса биоплёнок ризосферных бактерий рода *Azospirillum* / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции / III Всероссийская конференция, Владивосток, 7-12 сентября 2016 г. – Владивосток: Мор. гос. ун-т, 2016. – С. 45.
14. **Евстигнеева, С.С.** Изменение состава и структуры экстраклеточных полисахаридов и гликополимеров поверхности ассоциативных ризобактерий *Azospirillum brasilense* при адаптации к температурному стрессу / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // «Актуальные аспекты современной микробиологии»: X молодежная школа-конференция с международным участием, Москва, 27-30 октября 2015 г. – М.: МАКС, 2015. – С. 57-60.
15. **Евстигнеева, С.С.** Особенности состава и структуры гликополимеров поверхности и матрикса биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 / **С.С. Евстигнеева**, Я.В. Халэпа, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // VII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014», Екатеринбург, 6-11 октября 2014 г. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – С. 179-181.
16. **Евстигнеева, С.С.** Состав и соотношение жирных кислот в липидных компонентах гликополимеров поверхности бактерий *Azospirillum brasilense* при варьировании условий культивирования / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко,

С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции / II Всероссийская конференция, Саратов, 7-11 июля 2014 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2014. – С. 70.

17. **Yevstigneeva, S.S.** Fatty acid composition and ratio in the lipid components of the outer-membrane and capsular glycopolymers from *Azospirillum brasilense* bacteria at various times of culturing and nutrient-medium compositions / **S.S. Yevstigneeva**, E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov // The proceedings of the International Interdisciplinary Conference “Adaptation Strategy of the Living Systems”, Novy Svet, Ukraine, 12-17 May 2014. – Kyiv: VS Martynyuk Publisher, 2014. – P. 58-59.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубочайшую признательность своему научному руководителю к.б.н., доценту Ю.П. Федоненко за понимание, терпение и оказание бесценной помощи на различных этапах выполнения диссертационной работы.

Выражаю искреннюю благодарность за тесное и продуктивное сотрудничество коллегам из лаборатории биохимии ИБФРМ РАН: своему первому учителю – д.б.н., профессору С.А. Конновой, Заслуженному деятелю науки РФ, д.б.н., профессору (ныне покойному) В.В. Игнатову, к.б.н. Е.Н. Сигида, к.х.н. В.С. Гринёву, вед. инженеру Е.Е. Калашниковой. Также выражаю слова благодарности заведующему лабораторией генетики микроорганизмов – д.б.н. А.В. Шелудько, старшему научному сотруднику лаборатории иммунохимии – к.б.н. А.А. Широкову, ведущему инженеру лаборатории экологической биотехнологии – к.х.н. О.Е. Макарову и другим сотрудникам ИБФРМ РАН, которые участвовали на разных этапах проведения исследований и в обсуждении результатов, а также коллективу лаборатории химии углеводов ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва) за запись ЯМР спектров и помощь при их интерпретации.