

На правах рукописи

ГУМЕНКО РОМАН СЕРГЕЕВИЧ

**ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ИЗМЕНЁННОЙ
РЕГУЛЯЦИЕЙ ГЕНОВ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА**

03.02.07 – Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2020

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель:

Баймиев Андрей Ханифович

доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН

Официальные оппоненты:

Топунов Алексей Федорович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии им. Баха Федерального государственного научного учреждения «Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Вечерский Максим Валерьевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии, физиологии и функциональной морфологии высших позвоночных ФГБУН «Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» Российской Академии Наук (ИПЭЭ РАН) ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «14» октября 2020 г. в «10:00» часов на заседании Диссертационного совета Д 002.198.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком.№406).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБГ УФИЦ РАН (450054, Уфа, проспект Октября, 71), на сайте ИБГ УФИЦ РАН <http://ibg.anrb.ru/dissertacionnyj-sovet/dissertacii-soiskatelej/> и на сайте ВАК <http://vak.ed.gov.ru>

e-mail: molgen@anrb.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 002.198.01,
доктор биологических
наук



Корытина Гульназ
Фаритовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы и степень её разработанности. Усвоение молекулярного азота воздуха является одним из важнейших биологических процессов, от которого во многом зависит жизнь на нашей планете. Наиболее эффективными азотфиксаторами являются клубеньковые бактерии (ризобии) в симбиозе только с бобовыми растениями (за некоторым исключением).

К основным родам клубеньковых бактерий, вступающих в симбиоз с бобовыми растениями умеренного климата, относятся: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* (Zakhia F. et al., 2004). Данные микроорганизмы характеризуются высокой пластичностью генома, рекомбинационной активностью и активной вовлеченностью в процессы горизонтального обмена генами. Наиболее интенсивно в горизонтальном переносе генов (ГПГ) участвуют *sym*-гены (*symbiotic genes* – симбиотические гены). Основным способом ГПГ у ризобий является конъюгация (Проворов, 2012). Из-за того, что данный процесс часто прерывается, в клетку не всегда успевают попасть все гены необходимые для детерминации азотфиксации, и бактерия недостающие гены, теоретически, может добрать в следующем раунде конъюгации.

Поскольку в этом процессе могут участвовать не только представители одного вида, но и микроорганизмы разных таксонов, то это приводит к рекомбинации *nif*-генов (*nitrogen fixation genes* – гены азотфиксации) разных бактерий, что является элементом комбинативного эволюционного процесса (Kim, 1996; Remigi et al., 2016; Zheng et al., 2017). Известно, что гены коровых белков нитрогеназы организованы в один оперон и наследуются преимущественно вместе, чего нельзя сказать о генах вспомогательных белков азотфиксации, образующих у многих азотфиксирующих бактерий отдельные опероны. Особенно это характерно для ризобий, у которых наблюдается разобщенность *nif*-генов по разным оперонам (Boyd et al., 2015). С этой точки зрения данные микроорганизмы являются удобным объектом для исследования комбинативной эволюции азотфиксации у бактерий. К одному из наименее сцепленных с генами коровых белков, но, тем не менее, являющимся неотъемлемой частью нитрогеназной системы ризобий, относится ген *nifA*, кодирующий регуляторный белок NifA, от которого зависит запуск всей нитрогеназной системы микроорганизмов. Данный белок, представляющий собой энхансерный элемент, приводит к запуску экспрессии всех генов, участвующих в процессе азотфиксации, и является конечным звеном в сигнальном каскаде активации генов нитрогеназного комплекса (Aguilar et al., 1987; Paustain et al., 1989).

У симбиотических азотфиксаторов в свободноживущем состоянии при избытке кислорода ген *nifA* находится в репрессированном состоянии. В результате этого не происходит экспрессия генов нитрогеназного комплекса (Dixon, 2004) и выработка белков нитрогеназы. Поэтому клубеньковые бактерии не проявляют азотфиксирующей активности *ex planta*. Но на сегодняшний день существуют работы по активации генов нитрогеназного комплекса у свободноживущих азотфиксаторов за счет изменения регуляции экспрессии гена *nifA* (Buchanan-Wollaston, 1984). Известно, что конститутивная экспрессия данного гена у несимбиотических азотфиксаторов приводит к увеличению интенсивности азотфиксации (Kennedy, 1983; Kim, 1989), а также к появлению нитрогеназной активности при избытке соединений азота в среде (An et al., 2007).

В настоящей работе нами оценена возможность индукции нитрогеназной активности у ризобий в свободноживущем состоянии при искусственной активации экспрессии гена *nifA*. Благодаря такой способности можно будет использовать ген *nifA* клубеньковых бактерий в качестве удобного маркера при изучении функциональности гетерологичных комбинаций *nif*-генов, поскольку данный ген также: 1 - является неотъемлемой частью азотфиксирующего аппарата всех ризобий; 2 - не имеет жесткой сцепленности с генами коровых белков нитрогеназы. Поэтому по появлению нитрогеназной активности у клубеньковых бактерий *ex planta* при искусственной активации *nifA* гена можно будет судить о его функциональности в гетерологичной системе *nif*-генов.

Цель работы – исследование возможности активации генов нитрогеназного комплекса клубеньковых бактерий путем модификации регуляции гена *nifA*.

Задачи исследования:

1. Создать генно-инженерные конструкции с генами *nifA* родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* под управлением прокариотического промотора;
2. Получить рекомбинантные варианты штаммов клубеньковых бактерий родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*;
3. Провести оценку нитрогеназной активности у рекомбинантных штаммов при различных условиях культивирования;
4. Оценить ростостимулирующее влияние полученных рекомбинантных штаммов.

Научная новизна работы. Выявлено появление способности у клубеньковых бактерий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, фиксировать азот в свободноживущем состоянии при искусственной экспрессии дополнительной копии гена регуляторного белка NifA в их клетках. При этом нитрогеназная активность у исследованных рекомбинантных ризобий имеет достоверно детектируемый уровень. В то же время, клубеньковые бактерии рода *Ensifer*, имеющие дополнительную копию гена *nifA* под управлением промотора *Pm*, показали способность к фиксации азота на значительном уровне.

Практическая значимость работы. Получение штаммов клубеньковых бактерий с искусственной регуляцией азотфиксирующей активности, которые способны в несколько раз больше фиксировать азот *ex planta* по сравнению со свободноживущими азотфиксаторами, будет иметь важное практическое значение для растениеводства. Поскольку известно, что некоторые штаммы ризобий активно образуют ассоциативные симбиозы и с небобовыми растениями, то подобные бактерии в составе биоудобрений будут способны повышать урожайность растений за счет обеспечения их доступным азотом.

Методология и методы исследования. Методология исследования основывается на использовании системного подхода с применением методов молекулярной биологии, статистики, а также на анализе данных отечественной и зарубежной литературы. Основные методы исследования включали: выделение тотальной и плазмидной ДНК бактерий, подбор нуклеотидных последовательностей и химический синтез праймеров, полимеразную цепную реакцию, электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в агарозных гелях, молекулярное клонирование и секвенирование по Сэнгеру, вестерн-блот анализ белков, определение азотфиксирующей активности бактерий методом газовой хроматографии,

определение содержания нитратов и аммония ионометрическим методом и методом ЦИНАО с использованием современного оборудования.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) У клубеньковых бактерий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, можно индуцировать азотфиксирующую активность в свободноживущем состоянии путем трансформации в них экспрессионной конструкции с дополнительной копией гена *nifA*;
- 2) Уровень нитрогеназной активности рекомбинантных бактерий имеет непрямую зависимость от уровня экспрессии гена *nifA*.

Личный вклад соискателя. Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций.

Степень достоверности. Достоверность полученных данных подтверждается воспроизводимостью и многочисленностью проведённых экспериментов, а также наличием положительных и отрицательных контролей.

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны грантами РФФИ №16-04-00902, № 17-44-020201, № 16-34-00278 и грантом У.М.Н.И.К. (№ 0006039).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на второй всероссийской молодёжной научной школе-конференции «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург-2014), международной конференции «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (Санкт-Петербург, Пушкин-2016), VII всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов-2016), X всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (Уфа-2016), III Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино-2016), 21-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино-2017), научной конференции и школе молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, Крым-2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе 3 статьи, индексируемые в международных базах Web of Science или Scopus а также получен 1 патент на изобретение. Результаты работы были представлены на 10 конференциях в виде тезисов, стендовых и устных докладов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа "Получение штаммов клубеньковых бактерий с измененной регуляцией генов нитрогеназного комплекса" соответствует паспорту специальности 03.02.07 – Генетика. В работе исследована возможность изменения азотфиксирующего статуса микроорганизма с помощью искусственной регуляции экспрессии генов нитрогеназного комплекса клубеньковых бактерий.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 120 страницах, содержит 5 таблиц и 18 рисунков. Включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты исследования и их обсуждение (глава 3), заключение, выводы и список литературы.

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН (г. Уфа). Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., в.н.с., доц. Баймиеву Ан.Х. за неоценимую помощь в выполнении данной работы. Автор благодарит заведующего лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов Баймиева Ал. Х., а также весь коллектив лаборатории, коллег и друзей за помощь и поддержку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования, бактериальные штаммы и плазмидные векторы

Объектами исследования в данной работе служили штаммы бактерий из коллекции ИБГ УФИЦ РАН («Симбионт»), выделенные из клубеньков дикорастущих бобовых растений Южного Урала, относящихся к трибам *Fabeae*, *Trifolieae* и *Loteae*: горошка лесного (*Vicia sylvatica* L) – Vsy19, люцерны хмелевидной (*Medicago lupulina*) – Mlu10 и лядвенца жигулевского (*Lotus zhegulensis*) – Lzh7. В качестве контроля использовали штамм *Pseudomonas* p. K749 из коллекции микроорганизмов УИБ УФИЦ РАН.

В эксперименты по клонированию генов были взяты штаммы компетентных клеток *Rhizobium* sp. – Vsy19, *Mesorhizobium* sp. – Lzh7, *Ensifer* sp. – Mlu10, *E.coli* – NEB10. Для получения экспрессионных конструкций использовалась плазида широкого круга хозяев *pJB658* (Blatny et al., 1997; Khlebnikov et al., 2002; Sletta et al., 2004). Целевыми генами в работе по созданию экспрессионных конструкций служили гены, кодирующие структуру активатора транскрипции *nif*-генов (*nifA*), выделенные из штаммов клубеньковых бактерий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*.

Методы исследования

В работе использованы следующие методы: выделение высокомолекулярной бактериальной ДНК осуществлялось с помощью 1% лизирующего раствора (1% TritonX100, 1% Tween 20, 1% Chelex 100). ПЦР проводили с использованием стандартных наборов для амплификации ДНК. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК выполняли на автоматических секвенаторах ABI PRISM 310 фирмы “Applied Biosystems” (США), используя наборы для секвенирования «BigDye Terminator v.3.0» и GenomeLab фирмы Beckman Coulter. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergen (DNASTAR, США). Выделение плазмидной ДНК, анализ рекомбинантных клонов, клонирование амплифицированной ДНК, подготовку компетентных клеток и их трансформацию плазмидной ДНК, электрофорез фрагментов ДНК и их элюцию из легкоплавкой агарозы выполняли по прописям, изложенным в лабораторном руководстве Сэмбрука с соавт. (Sambrook et al., 1989). Комплементарную мРНК получали при помощи фермента MMLV-ревертазы. Индукция экспрессии генов осуществлялась индуктором *m*-толуоловой кислотой (плазида *pJB658*-промотор *P_m*) в концентрации 0,5 мМ. Вестерн-блот анализ проводили согласно методике Towbin (Towbin et al., 1979). Определение КОЕ бактерий осуществляли по методу Коха. Нитрогеназную активность бактерий определяли «ацетиленовым» методом на хроматографе Shimadzu-GC 2014 (Умаров, 1986; Минеев, 2001). Содержание обменного аммония почвы устанавливали по методу ЦИНАО (ГОСТ 26489-85). Определение нитратов делали ионометрическим методом

(ГОСТ 26951-86). Для выявления статистической достоверности различий между средними значениями уровней азотфиксации, между выборками рекомбинантных клонов бактерий и бактерий из контрольной группы использовали Т-критерий Стьюдента ($t_{0,95}=2,8$) (в каждой выборке проводилось 50 измерений) (Лакин, 1990; Гланц, 1999). Работа выполнена частично на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор объектов исследования

Наиболее распространенными родами клубеньковых бактерий, которые вступают в симбиоз с бобовыми растениями умеренного климата, являются *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Ensifer* (Баймиев, 2015; Иванова, 2016; Иванова, 2017). Выбор объектов исследования осуществлялся из числа представителей перечисленных родов ризобий по следующим критериям. Во-первых, штаммы должны были быть эффективными, т.е. иметь хорошую клубенкообразующую и азотфиксирующую активности, что свидетельствовало бы о присутствии полного набора необходимых для азотфиксирующего симбиоза генов. Во-вторых, неустойчивыми к действию антибиотиков для возможности селекции рекомбинантных штаммов после их трансформации. Штаммы, удовлетворяющие нас по условиям эффективности, были отобраны из коллекции симбиотических микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН «Симбионт» (<http://ibg.anrb.ru/naychnaya-deyatelnost/bioresyrs/kollekciya-simbioticheskix-mikroorganizmov/>). Далее эти микроорганизмы были проверены на устойчивость к действию антибиотиков ампициллина (Am) и гентамицина (Gm), которые используются в качестве маркеров при скрининге рекомбинантных клонов. Было выявлено, что ризобии разных родов имеют значительные различия в резистентности к их действию. Наименее устойчивыми к обоим антибиотикам оказались бактерии рода *Rhizobium*. Наибольшую резистентность показали бактерии рода *Ensifer*, что обусловлено, скорее всего, наличием полисахаридной капсулы, препятствующей проникновению антибиотиков в клетку (табл. 1). В дальнейшем из числа образцов, неустойчивых к Gm и Am, были отобраны штаммы с наибольшей азотфиксирующей активностью на одно инокулированное растение.

Таблица 1.

Оценка устойчивости эффективных клубеньковых бактерий к антибиотикам гентамицину (Gm) и ампициллину (Am).

Род бактерий	Кол-во исследованных штаммов	Количество устойчивых штаммов ризобий к антибиотикам Gm и Am	
		Gm	Am
<i>Rhizobium</i>	34	0	10
<i>Mesorhizobium</i>	42	2	16
<i>Ensifer</i>	58	50	57

Таким образом, для данного исследования были выбраны штаммы, относящиеся к родам *Mesorhizobium* (LZh7), *Ensifer* (MLu10) и *Rhizobium* (Vsy9), которые отличались высокой азотфиксирующей активностью и оказались неустойчивыми к

действию ампициллина и гентамицина. Род *Bradyrhizobium* из работы был исключен ввиду крайней сложности получения у таких бактерий рекомбинантных клонов.

У отобранных штаммов были амплифицированы и клонированы в плазмидный вектор *pAL-2T* гены *nifA*, а на следующем этапе работы были определены их нуклеотидные последовательности. С помощью сравнительного анализа было показано, что выбранные нами штаммы содержат в составе своего генома гены *nifA*, характерные для своего рода. Известно, что бактерии рода *Mesorhizobium* содержат две копии гена регуляторного белка NifA: *nifA1* и *nifA2* (Sullivan, 2013). Нами для работы была клонирована последовательность гена, которая соответствует варианту гена *nifA2* (рис. 1).

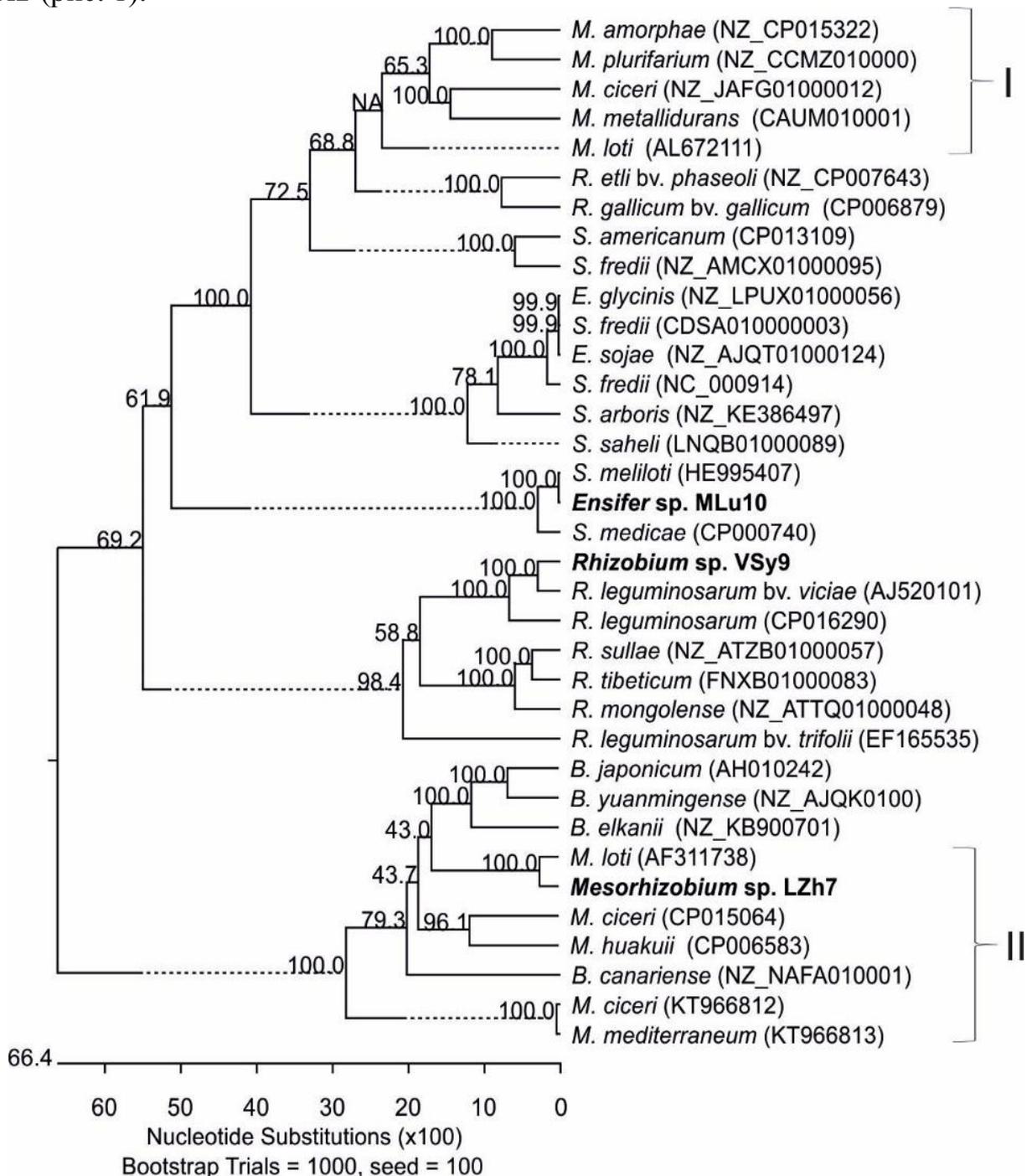


Рис. 1. Филогенетическое дерево клубеньковых бактерий, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей гена *nifA*. Жирным шрифтом отмечены исследованные нами штаммы микроорганизмов.

Создание генно-инженерных конструкций с геном *nifA* и получение рекомбинантных штаммов ризобий

У симбиотических азотфиксаторов при избытке кислорода ген *nifA* находится в репрессированном состоянии, в результате чего не происходит активации генов нитрогеназного комплекса (Dixon and Kahn, 2004) и выработки белков нитрогеназы. Следовательно, клубеньковые бактерии не проявляют азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии. С другой стороны существуют работы по активации генов нитрогеназного комплекса за счет изменения регуляции экспрессии гена *nifA* у свободноживущих азотфиксаторов (Kennedy and Robson, 1983), где конститутивная экспрессия данного гена у них приводила к увеличению интенсивности азотфиксации (Kim et al., 1989) и появлению нитрогеназной активности при избытке соединений азота в среде (An et al., 2007), чего не наблюдалось у диких типов бактерий. Возможность запуска у ризобий нитрогеназной активности на детектируемом уровне в свободноживущем состоянии при искусственной активации экспрессии гена *nifA* позволит использовать данный ген в качестве удобного маркера при изучении функциональности гетерологичных комбинаций *nif*-генов у клубеньковых бактерий, образующихся в ходе горизонтального переноса и рекомбинационных процессов у бактерий.

Ранее нами уже была показана принципиальная возможность искусственной индукции азотфиксирующей активности *ex planta* у ризобий, а именно был получен рекомбинантный штамм *R. leguminosarum* 1078, который содержал в составе своего генома плазмидную конструкцию, несущую дополнительную копию гена регуляторного белка NifA под контролем конститутивного промотора фага T5 (Иванова, 2014).

В данной работе по исследованию возможности активации азотфиксации *ex planta* у клубеньковых бактерий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, при создании генно-инженерных конструкций было решено использовать индуцируемый бактериальный промотор *Pm* для контроля целевого гена. Это обусловлено рядом причин. Во-первых, применение конститутивного промотора фага T5 в конструкции приводило в дальнейшем к низкой эффективности ее трансформации в клетки ризобий, а во-вторых, использование данного промотора негативно сказывалось на скорости роста бактерий и их стабильности, что по нашим предположениям, вызвано наложением чрезмерной нагрузки на клетку экспрессией гена рекомбинантного регуляторного белка.

Кроме того, в системе *Pm/xylS* биосинтез белка стимулируется пропорционально увеличению количества копий вектора (Blatny et al., 1997; Sletta et al., 2004). Высокий уровень экспрессии промотора *Pm* поддерживается на всей кривой роста при помощи разных σ -факторов путем переключения между ними в разные фазы роста. В процессе роста в рекомбинантных клетках обычно поддерживается низкий или средний уровень копийности данной плазмиды. Высокий уровень экспрессии *XylS* ускоряет конститутивную транскрипцию из *Pm* и препятствует элиминированию плазмиды из клетки (Bettenbaugh et al., 1989; Bentley et al., 1991).

Для проверки возможности регуляции экспрессии гена *nifA* на основе плазмиды широкого круга хозяев *pJB658*, содержащей систему *Pm/xylS*, нами были созданы генно-инженерные конструкции с генами *nifA* бактерий (рис. 2):

1. *Rhizobium* sp. – штамм VSy9PmNifA с конструкцией *pJB658RhizonifA*;

2. *Ensifer* sp. – штамм MLu10PmNifA с конструкцией *pJB658SinorhnifA*;
3. *Mesorhizobium* sp. – штамм LZh7PmNifA с конструкцией *pJB658MesorhnifA*.

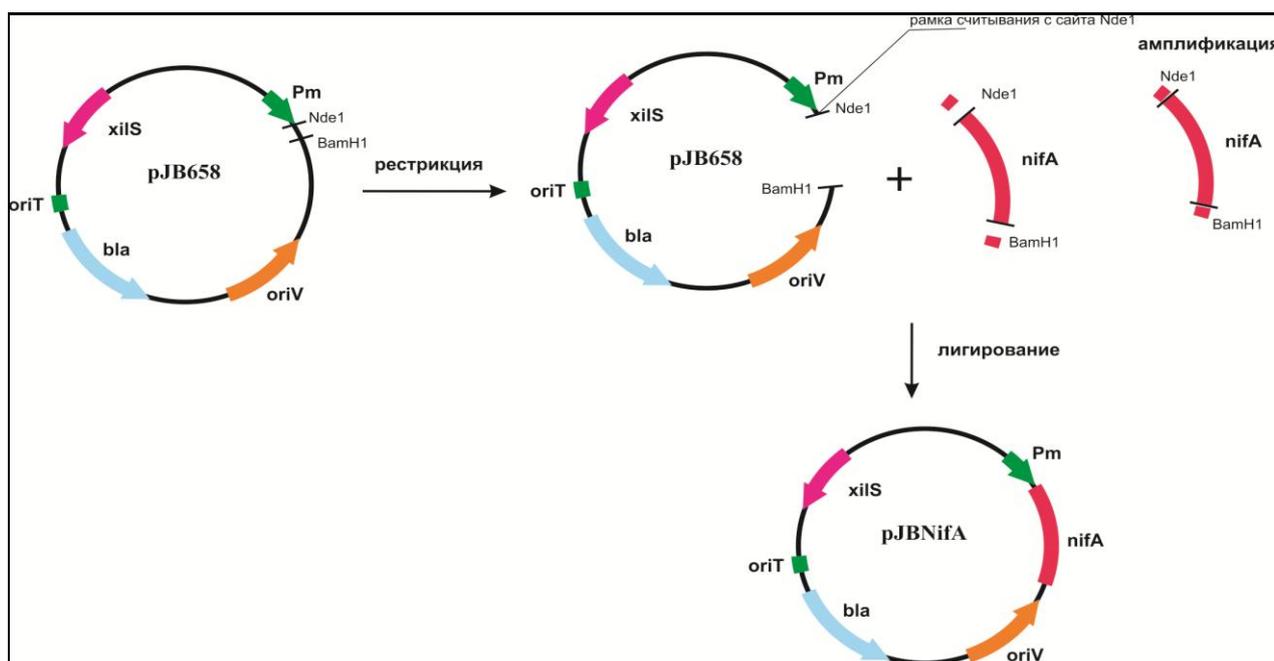


Рис. 2. Стратегия клонирования генов *nifA* в плазмиду *pJB658*.

Для того чтобы удостовериться в их работоспособности, нами была создана подобная конструкция, содержащая вместо целевого гена репортерный ген зеленого флуоресцентного белка *TurboGFP*. После ее трансформации в компетентные клетки штаммов *Rhizobium* sp. – VSy9, *Ensifer* sp. – MLu10 и *Mesorhizobium* sp. – LZh7 на среде с *m*-толуоловой кислотой образовывались зеленоокрашенные клоны бактерий, что свидетельствовало о функциональности промотора *Pm* в анализируемых образцах.

На следующем этапе работы полученные конструкции с генами *nifA* были трансформированы в вышеперечисленные штаммы ризобий. По сути, в бактериальные клетки была добавлена своя же копия гена *nifA*, находящаяся под регуляцией индуцируемого промотора. Таким образом, были созданы рекомбинантные микроорганизмы на основе штаммов-доноров целевого гена.

Анализ нитрогеназной активности рекомбинантных штаммов бактерий

В дальнейшем, согласно поставленной цели, рекомбинантные штаммы с помощью ацетиленового метода были проанализированы на появление у них азотфиксирующей активности. Титр исследуемых бактерий в каждой пробе составлял $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Данный анализ проводился с применением газового хроматографа.

В ходе исследования были получены следующие данные. Для исключения ложноположительного результата все исходные штаммы клубеньковых бактерий культивировались на питательной среде YM без индуктора и с индуктором. В результате, ни в одном из образцов не было обнаружено детектируемого уровня азотфиксации *ex planta*, что свидетельствовало об ингибированном состоянии нитрогеназного комплекса данных азотфиксаторов.

Во всех опытах в качестве положительного контроля (контроля сравнения) использовался свободноживущий азотфиксирующий штамм бактерий *Pseudomonas* sp. K749, при этом зависимости его уровня азотфиксации от наличия или отсутствия индуктора в питательной среде выявлено не было.

С другой стороны, у рекомбинантного штамма *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA при культивировании на питательной среде без индуктора обнаружено появление детектируемого уровня азотфиксации *ex planta*. Хотя он значительно был меньше, чем уровень азотфиксации у контроля сравнения. Интересным является то, что при добавлении индуктора в среду мы наблюдали снижение активности нитрогеназы (рис. 3).

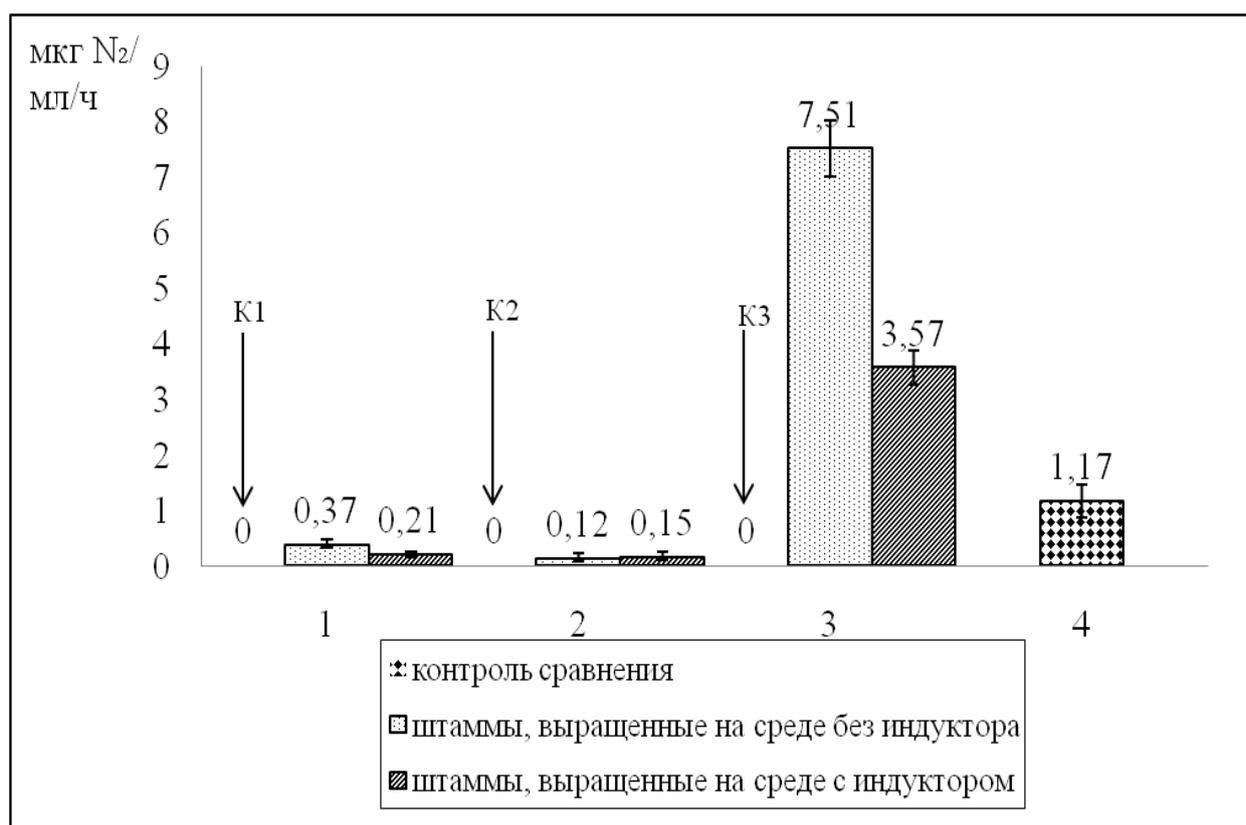


Рис. 3. Диаграмма анализа уровня нитрогеназной активности рекомбинантных штаммов бактерий. 1 – Рекомбинантный штамм *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA; 2 – Рекомбинантный штамм *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA; 3 – Рекомбинантный штамм *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA с индукцией; 4 – Контроль сравнения – штамм *Pseudomonas* sp. K749; K1, K2, K3 – дикие варианты штаммов клубеньковых бактерий.

У рекомбинантного штамма *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA при анализе также была выявлена нитрогеназная активность. Как и в предыдущих вариантах азотфиксация полученным рекомбинантным штаммом происходила как на среде с индуктором, так и без него. У данного образца индукция гена *nifA* не меняла достоверно уровень восстановления ацетилена (рис. 3). Как нами упоминалось выше, бактерии рода *Mesorhizobium* содержат две копии гена регуляторного белка NifA: *nifA1* и *nifA2* (Sullivan, 2013; Gamez-Reyes et al., 2017). Поскольку было показано, что в регуляции генов азотфиксации участвует вариант *nifA2* гена, а *nifA1* мутант не оказывал влияния на азотфиксирующую активность (Nukui, 2006), в данной работе нами был использован только один вариант гена, гомологичный варианту *nifA2* (рис. 1). Появление в нашем случае у рекомбинантного штамма *Mesorhizobium* sp. LZh7nifA

способности восстанавливать ацетилен до этилена в свободноживущем состоянии подтверждает тот факт, что именно вариант *nifA2* гена регуляторного белка NifA участвует в активации нитрогеназного комплекса.

Совершенно неожиданный результат был получен при анализе рекомбинантного штамма *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA. У данных микроорганизмов также была обнаружена способность к восстановлению ацетилена. При этом уровень нитрогеназной активности у рекомбинантного штамма *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA был почти в 7 раз выше, чем у штамма *Pseudomonas* sp. K749. При этом индукция приводила к снижению активности нитрогеназы (рис. 3).

Надо отметить, что концентрация индуктора, используемая в работе, нами была выбрана по результатам серии опытов по его подбору: были проверены концентрации 0,1мМ, 0,5мМ, 1мМ, 5мМ и 10мМ *m*-толуоловой кислоты (рис. 4).

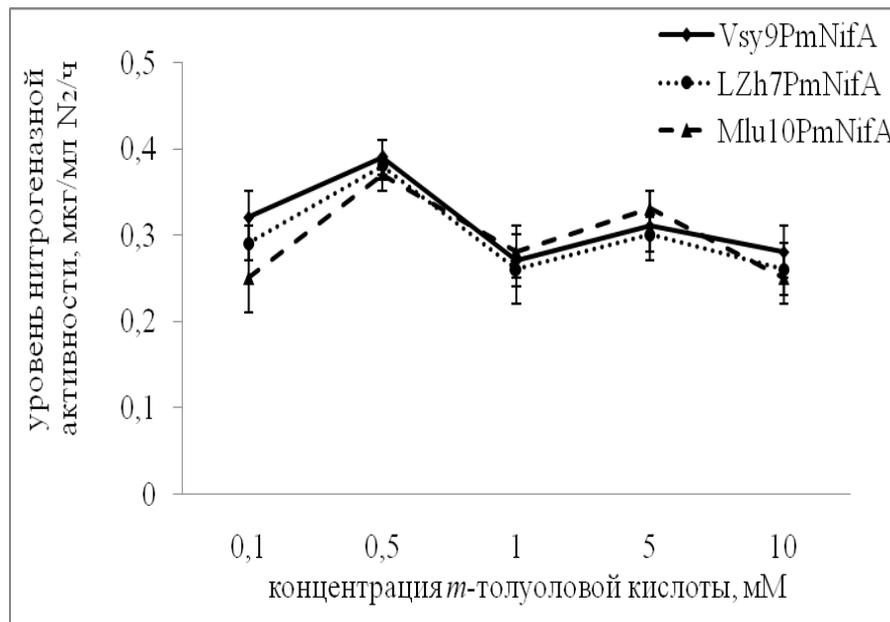


Рис. 4. Подбор эффективной концентрации индуктора *m*-толуоловой кислоты для промотора *Pm*.

Эффективность определяли по уровню возникающей азотфиксирующей активности у рекомбинантных штаммов в свободноживущем состоянии. В последующем концентрация равная 0,5 мМ *m*-толуоловой кислоты, которая показала какое-то повышение индукции, была использована в опытах в дальнейшей работе.

Таким образом, было показано, что искусственная активация гена *nifA* у всех взятых в анализ штаммов бактерий, относящихся к трем основным родам ризобий, приводит к появлению у них нитрогеназной активности *ex planta*.

Оставалось неясным, почему нитрогеназная активность появляется без индукции целевого гена, а индукция приводит к неоднозначным результатам. По нашему мнению, объяснение может заключаться в минимальной базальной экспрессии целевого гена под регуляцией промотора *Pm*, в результате которой нарабатывается незначительная продукция целевого белка, запускающего процесс азотфиксации. При индукции гена *nifA* происходит незначительное изменение нитрогеназной активности у рекомбинантных штаммов всех трех родов бактерий. На сегодняшний день в литературе нет данных о зависимости активности нитрогеназы от

количества белка NifA у ризобий. Скорее всего, для индукции азотфиксирующей активности достаточно небольшой концентрации регуляторного белка, а её уровень зависит уже от других факторов, таких как парциальное давление кислорода, путей азотного и углеродного обмена и т.д.

Для проверки данного предположения был проведен ОТ-ПЦР анализ экспрессии регуляторного гена *nifA*, а также одного из генов коровых белков нитрогеназы – *nifH* у полученных нами рекомбинантных штаммов. Было выявлено, что при индукции промотора транскрипция целевого гена увеличивается по сравнению с транскрипционной активностью генов у неиндуцированных штаммов (рис. 5).



Рис. 5. ОТ-ПЦР анализ транскрипционной активности гена *nifA* в клетках рекомбинантных штаммов VSy9PmNifA, LZh7PmNifA, Mlu10PmNifA. 1 – нерекомбинантные штаммы бактерий *Rhizobium* sp. VSy9, *Mesorhizobium* sp. LZh7, *Ensifer* sp. Mlu10; 2 – рекомбинантные штаммы бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA без индукции; 3 – рекомбинантные штаммы бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA с индукцией; 4,5 – ОТ-ПЦР тотального препарата нуклеиновых кислот рекомбинантных бактерий после обработки ДНКазой.

Было обнаружено, что при индукции промотора транскрипция целевого гена увеличивается по сравнению с транскрипционной активностью генов у неиндуцированных штаммов. Вероятно, в этом случае нарабатывается очень мало матричной РНК, в связи с чем она почти не детектируется. Тем не менее, уровень азотфиксирующей активности абсолютно не коррелирует с этими данными, что может говорить о том, что данный уровень не имеет линейной зависимости от концентрации регуляторного белка NifA (Баймиев, 2019).

При анализе экспрессии гена *nifH* было обнаружено, что транскрипция данного гена наблюдается как при индукции экспрессии гена *nifA*, так и без нее (рис.6).

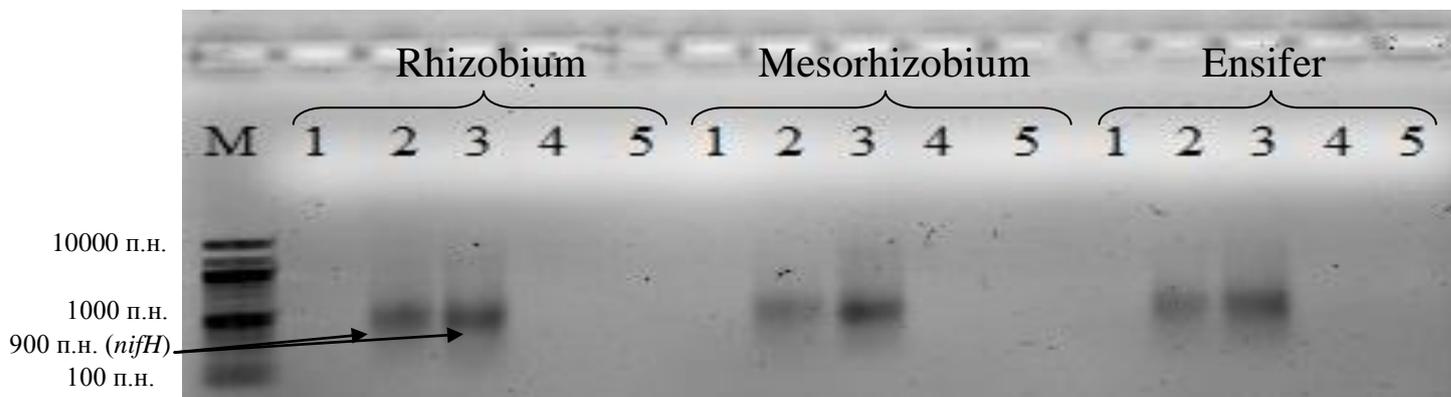


Рис. 6. ОТ-ПЦР анализ транскрипционной активности гена *nifH* в клетках рекомбинантных штаммов VSy9PmNifA, LZh7PmNifA, Mlu10PmNifA. 1 – нерекомбинантные штаммы бактерий *Rhizobium* sp. VSy9, *Mesorhizobium* sp. LZh7, *Ensifer* sp. Mlu10; 2 – рекомбинантные штаммы бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA без индукции; 3 – рекомбинантные штаммы бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA с индукцией; 4,5 – ОТ-ПЦР тотального препарата нуклеиновых кислот рекомбинантных бактерий после обработки ДНКазой.

Таким образом, общий уровень наработки матричной РНК гена *nifH* не коррелирует с уровнем экспрессии регуляторного белка NifA, что еще раз подтверждает сложный многоступенчатый механизм индукции азотфиксирующей активности у ризобий.

Далее с помощью вестерн-блот и вестерн-дот-блот анализа у всех вариантов штаммов была проверена степень наработки самого белка нитрогеназы NifH. Для обнаружения данного белка были использованы поликлональные куриные антитела, полученные к NifH (Agrisera, Швеция). Детекцию первичных связанных с антигеном антител на мембране проводили с помощью вторичных кроличьих антител на поликлональные куриные антитела, меченные пероксидазой хрена HRP (Agrisera, Швеция). В результате анализа белков, иммунореактивных к поликлональным куриным антителам, полученным к пептиду NifH, были обнаружены полосы около 32,5 кДа, что соответствует ожидаемому размеру белка NifH. Было показано, что при вестерн-блот анализе тотального белка бактерий проявляется только одна полоса, соответствующая целевому белку, в отличие от анализа белков клубенька растений, где наблюдалась некоторая неспецифика (рис.7). Поэтому в дальнейшем для анализа белка микроорганизмов был использован вестерн-дот анализ, позволяющий анализировать большое количество образцов.

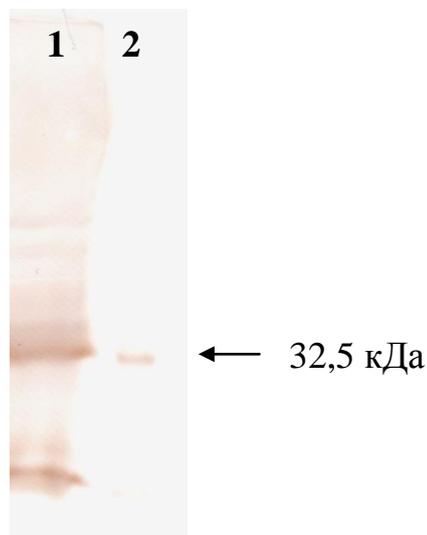


Рис. 7. Вестерн-блот анализ белка NifH: 1 – белок NifH, выделенный из клубеньков люцерны посевной; 2 – белок NifH, выделенный из клеток свободноживущего азотфиксатора штамма *Pseudomonas* sp. K749.

Как и ожидалось, белки нитрогеназы у диких штаммов в свободноживущем состоянии отсутствуют. Во всех рекомбинантных штаммах белок NifH нарабатывается как при индукции, так и без нее (рис. 8). При этом добавление индуктора не приводит к значительному изменению количества исследуемого белка. Причиной этому может быть то, что в неиндуцируемых клетках уже наблюдается экспрессия *nifH*, и дополнительная индукция уже не может существенно повлиять на его уровень. В пользу этого говорит и то, что в некоторых случаях индукция гена *nifA* наоборот приводит к снижению экспрессии гена нитрогеназы, что может быть следствием чрезмерной нагрузки на клетку. Кроме того, азотфиксирующая активность штаммов не коррелирует с количеством нарабатываемого белка. Это может быть свидетельством того, что одной нитрогеназы недостаточно для полноценной азотфиксации и необходимо участие и других механизмов в клетке (Oelze, 2000; Boyd, 2013; Boyd et al., 2015).

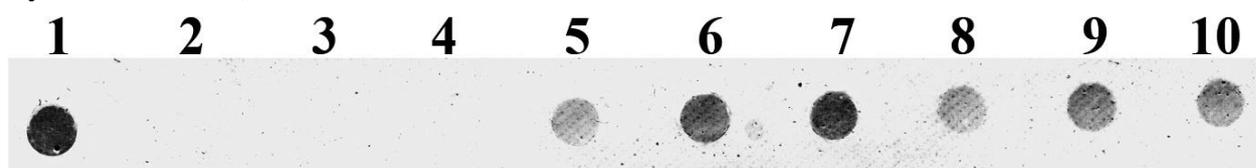


Рис. 8. Дот-блот анализ продукции белка NifH рекомбинантными штаммами клубеньковых бактерий, выращенных на питательной среде без добавления индуктора и с добавлением индуктора *m*-толуоловой кислоты (0,5 мМ). 1 – положительный контроль штамм *Pseudomonas* sp. K749; 2 – нерекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy9; 3 – нерекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. Mlu10; 4 – нерекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh7; 5 – рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, культивируемый на среде без индуктора; 6 – рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, культивируемый на среде без индуктора; 7 – рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, культивируемый на среде без индуктора; 8 – рекомбинантный штамм бактерий *Rhizobium* sp. VSy9PmNifA, культивируемый на среде с индуктором; 9 – рекомбинантный штамм бактерий *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, культивируемый на среде с индуктором; 10 – рекомбинантный штамм бактерий *Mesorhizobium* sp. LZh7PmNifA, культивируемый на среде с индуктором.

В связи с вышеизложенным можно отметить, что посредством изменения регуляции экспрессии гена *nifA* возможно индуцировать у всех анализированных родов клубеньковых бактерий азотфиксирующую способность вне растений. Степень которой имеет непрямую зависимость от уровня экспрессии регуляторного белка. Нитрогеназная активность у рекомбинантных по гену *nifA* штаммов, при этом, имеет уверенно детектируемый уровень, хотя он значительно меньше такового у свободных азотфиксаторов. В отдельных случаях рекомбинантные штаммы могут проявлять супер азотфиксирующие свойства, которые значительно превосходят данные свойства у свободноживущих азотфиксаторов (Иванова, 2014, Гуменко, 2017; Баймиев, 2019).

Оценка ростостимулирующей активности рекомбинантных штаммов

Взаимоотношения растений и ростостимулирующих микроорганизмов - сложный процесс, в котором задействованы продукты десятков генов. Любые изменения в данном механизме могут в ту или иную сторону повлиять на продуктивность растений. Поэтому нами было исследовано влияние изменения регуляции азотфиксации у рекомбинантных ризобий на их ростостимулирующие свойства по сравнению с исходными штаммами. Для этого нами был проделан ряд ростовых и мелкоделяночных опытов.

В качестве опытного растения нами был использован ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare*), как наиболее отзывчивая на содержание минерального азота в почве культура.

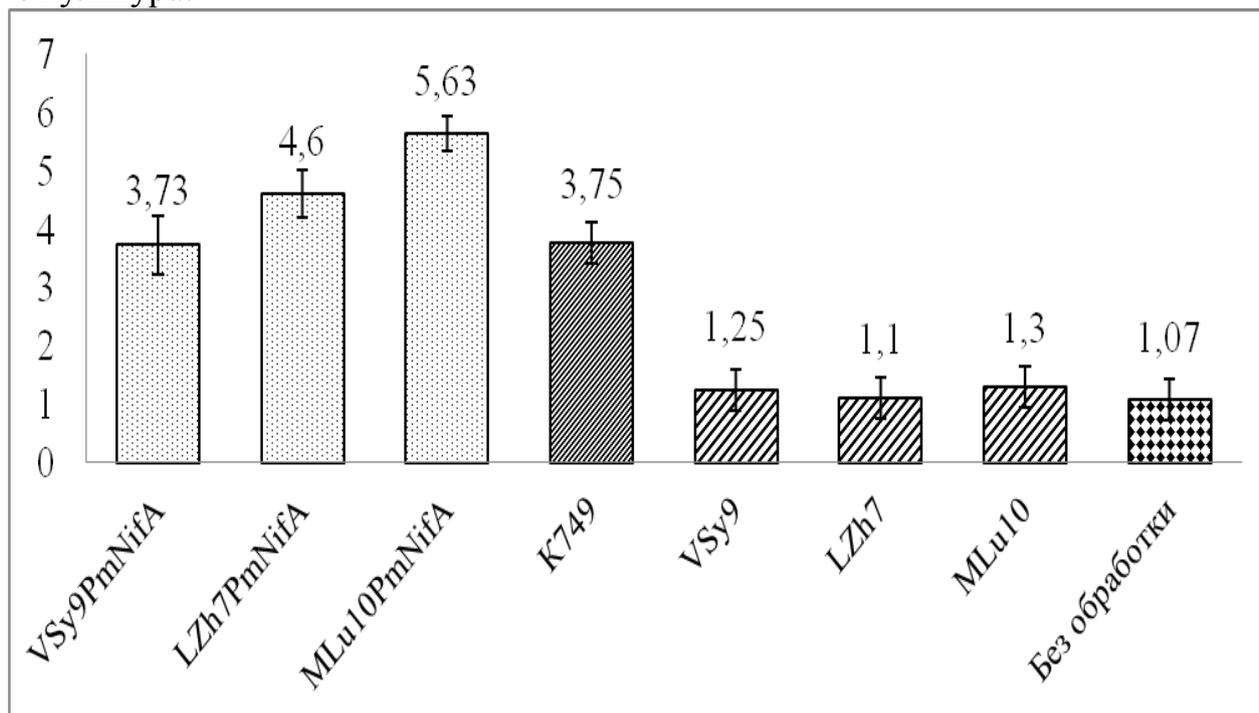


Рис. 9. Оценка ростостимулирующего влияния рекомбинантных штаммов бактерий на растения ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*).

Все рекомбинантные штаммы оказали достоверное ростостимулирующее влияние на растения ячменя по сравнению с контрольными штаммами. При этом наиболее эффективными в этом опыте оказались штаммы бактерий *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA (рис.9) (Гуменко, 2016).

Кроме того было выявлено, что наличие в клетках ризобий дополнительной копии гена *nifA* под управлением бактериальных промоторов не оказывает существенного влияния на их клубенекообразующие активности. Показатель клубенекообразования у бобовых растений, обработанных дикими типами штаммов и рекомбинантными штаммами, не имел достоверных различий.

Исключение составил штамм *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, показавший наибольшую нитрогеназную активность, инокуляция которым не приводила к образованию клубеньков. Вероятно, у него за счет рекомбинации произошли более существенные изменения в экспрессии генов, участвующих в образовании симбиоза, по сравнению с другими рекомбинантными бактериями. Исследование ростостимулирующих свойств данного штамма на люцерне, из клубеньков которой был получен исходный штамм, показало увеличение зеленой массы растений, но меньшее, чем при инокуляции растения диким вариантом штамма (рис. 10, табл.2).



Рис. 10. Сравнение ростовых показателей люцерны посевной (*Medicago sativa*): 1 - без инокуляции клубеньковыми бактериями; 2 - с инокуляцией рекомбинантным штаммом *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA; 3 - с инокуляцией штаммом *Ensifer* sp. Mlu10 (дикий тип).

Таблица 2.
Результаты ростовых опытов.

Опыт	Масса (г)
Контроль (люцерна без обработки)	7,7±1,3
Опыт №1 (люцерна, обработанная рекомбинантным штаммом <i>Ensifer</i> sp. Mlu10 с вектором <i>pJB658SinorhnifA</i>)	10,3±0,5
Опыт №2 (люцерна, обработанная <i>Ensifer</i> sp. Mlu10)	14,2±0,7

Таким образом, появление азотфиксирующих свойств у штамма *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA в свободноживущем состоянии придает ему определенные ростостимулирующие свойства при ассоциативном взаимодействии с растениями, но

уровень стимуляции роста при этом меньше, чем при эндосимбиотической азотфиксации с образованием клубеньков.

Поскольку у рекомбинантных штаммов была обнаружена азотфиксирующая активность, то нами было проведено исследование по измерению количества азотных соединений в почве при привнесении в неё исследуемых штаммов и без них. Было показано, что после 30 дней инокуляции данными бактериями почвы в большинстве случаев достоверных отличий с контролем не было обнаружено. Исключение составил опыт, при котором почва была обработана штаммом *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA. В результате произошло существенное увеличение в ней аммонийного азота, в то время как количество нитратного азота значительно уменьшилось (табл.3).

Таблица 3.

Анализ состава и количества азотных соединений в почве.

Образец	NH ₄ сол., мг/кг	NO ₃ квасц., мг/кг
Почва без обработки (контроль)	30,9±3,2	1050,1±11,2
Инокуляция диким штаммом Mlu10	31,2±2,7	1050,1±12,1
Инокуляция рекомбинантным штаммом Mlu10PmNifA	83,6±1,6*	355,3±7,2*
Инокуляция диким штаммом Vsy9	29,9±3,3	1050,1±11,2
Инокуляция рекомбинантным штаммом Vsy9PmNifA	31,9±3,2	1051,1±11,1
Инокуляция диким штаммом LZh7	30,7±3,2	1049,9±11,1
Инокуляция рекомбинантным штаммом LZh7PmNifA	33,5±3,2	1050,1±11,2

Если увеличение аммонийного азота можно объяснить накоплением его за счет азотфиксации, то снижение количества нитратов остается непонятным. Вероятно, что у бактерий могло активироваться нитратное дыхание. Для бактерий рода *Ensifer* такая возможность уже была описана. Например, у *E. meliloti* 1021 было обнаружено нитратное дыхание при первоначальной инкубации в условиях низкой концентрации кислорода (2%) (Torres, 2013). Способность к бескислородному дыханию может быть основной причиной высокой нитрогеназной активности рекомбинантного штамма *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA, поскольку в этом случае азотфиксирующий аппарат бактерии не подвержен к ингибирующему действию кислорода, что дает возможность нитрогеназе свободно осуществлять свою функцию. Денитрификация, выполняемая ризобиями, играет ключевую роль в предотвращении раннего образования клубеньков. При наличии нитратов в почве происходит значительное снижение уровня экспрессии *nod*-генов (генов клубенекобразования). В результате чего, клубеньки на корневых волосках люцерны посевной не образуются (Bobik et al., 2006; Cabeza et al., 2014). Потеря рекомбинантными штаммами клубенекобразующей активности и появление у них нитратного дыхания могут оказаться взаимосвязанными процессами (Баймиев, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процесс азотфиксации у микроорганизмов находится под строгим контролем и его запуск происходит только при определенных условиях. За это отвечает многоступенчатая система регуляции. Последним этапом транскрипционной регуляции у многих азотфиксирующих бактерий, в том числе и микроорганизмов, входящих в состав группы клубеньковых бактерий, является запуск экспрессии генов нитрогеназного комплекса за счет их активации регуляторным белком NifA. У ризобий синтез нитрогеназы осуществляется только при симбиозе с бобовыми (за одним исключением) растениями. В связи с этим в сапрофитном состоянии, по крайней мере, представители родов *Mesorhizobium*, *Ensifer* и *Rhizobium* не способны к фиксации азота. В данной работе была исследована возможность модификации регуляции азотфиксации у клубеньковых бактерий *Mesorhizobium*, *Ensifer* и *Rhizobium* путем привнесения в их геном дополнительной копии гена *nifA* под регуляцией бактериального индуцируемого промотора. Показано, что экспрессия *nifA* в рекомбинантных клетках всех трех родов бактерий приводит к появлению незначительной нитрогеназной активности. При этом её уровень не имеет явной корреляции с уровнем экспрессии гена *nifA*, что, скорее всего, является следствием многоступенчатости регуляции азотфиксации. Наиболее интересными являются результаты, полученные при трансформации клубеньковых бактерий рода *Ensifer* конструкцией *pJB658*, при которой рекомбинантный штамм *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA показал более высокую нитрогеназную активность в свободноживущем состоянии по сравнению с таковой у контрольного азотфиксирующего штамма *Pseudomonas* sp. K749. При этом штаммом была утеряна клубенекообразующая активность, а также наряду с нитрогеназной активностью у рекомбинантных бактерий выявлена нитратредуктазная активность, что может свидетельствовать о включении у данных микроорганизмов процесса нитратного дыхания. Все эти данные говорят о сложном механизме, участвующем в регуляции процесса фиксации азота. Таким образом, методом модификации регуляции экспрессии гена регуляторного белка NifA возможно индуцировать нитрогеназную активность у клубеньковых бактерий в свободноживущем состоянии.

При выполнении данной работы нами также было выявлено, что рекомбинантные клоны клубеньковых бактерий обладают крайней нестабильностью. Вероятно, это объясняется эволюционным фактором, при котором бактерии сохраняют только тот набор генов, который необходим им для выживания в определенный момент времени.

На данный момент механизмы регуляции биологической азотфиксации до конца не раскрыты. При этом изучение в данной области имеет несомненный практический интерес в сфере получения высокоэффективных азотфиксирующих штаммов, которые могут стать основой для получения биоудобрений для различных видов ценных сельскохозяйственных культур.

ВЫВОДЫ

1. У клубеньковых бактерий, относящихся к родам *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, искусственная индукция экспрессии дополнительной копии их же генов *nifA* приводит к появлению азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии.
2. Уровень возникающей нитрогеназной активности не имеет линейной зависимости от уровня экспрессии введенной дополнительной копии гена *nifA*.
3. Азотфиксирующая активность у рекомбинантного штамма *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA в несколько раз превышает таковую у свободноживущего азотфиксирующего штамма *Pseudomonas* sp. K749.
4. Инокуляция почвы рекомбинантным штаммом *Ensifer* sp. Mlu10PmNifA приводит к накоплению в ней аммонийного азота и уменьшению количества нитратного азота, что может быть свидетельством включения нитратного дыхания у данных бактерий.
5. Показано ростостимулирующее влияние полученных рекомбинантных штаммов клубеньковых бактерий на культуре ячменя.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Баймиев Ан.Х. Искусственная регуляция генов, кодирующих белки нитрогеназного комплекса ризобияльных бактерий // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – Т. 174. – № 13 – С. 36-39.
2. Баймиев Ан.Х., Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Чубукова О.В., Баймиев Ал.Х. Анализ симбиотических генов клубеньковых бактерий бобовых растений Южного Урала // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 12. – С. 1359–1367.
3. Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Саргалиева Г.М., Баймиев Ан.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий бобовых растений *Lupinaster* sp // Вестник защиты растений. – 2016. – Т. 3. – №8 9. – С.75-76.
4. Гуменко Р.С., Иванова Е.С., Саргалиева Г.М., Баймиев Ан.Х. Использование клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых растений Южного Урала в качестве основы для биоудобрений // Вестник защиты растений. – 2016. – Т. 3. – № 89. – С.57-58.
5. Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Маркеры для поиска клубеньковых бактерий на основе симбиотических генов // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 5. – С. 621-628.
6. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х. Искусственная активация экспрессии *nif*-генов у клубеньковых бактерий *explanta* // Экологическая генетика. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 35-42.
7. Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., Владимирова А.А., Кагирова А.С., Баймиев Ан.Х. Генетическая регуляция азотфиксации у бактерий // Биомика. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 340-344.

Патент

1. Патент на изобретение «Способ увеличения срока годности биоудобрения на основе клубеньковых бактерий» №2015119217 от 10.01.2017.

Материалы конференций

1. Гуменко Р.С., Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Изучение искусственной регуляции экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса для создания высокоэффективных биоудобрений на основе клубеньковых бактерий. В сборнике тезисов: X Всероссийской научной интернет-конференции «Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» // Уфа. –2016. – С. 113.
2. Гуменко Р.С., Иванова Е.С., Баймиев Ан.Х. Клубеньковые бактерии Южного Урала как основа высокоэффективных биоудобрений. В сборнике тезисов: VII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» // Саратов. – 2016. – С. 107.
3. Иванова Е.С., Гуменко Р.С., Баймиев Ан.Х. Создание экспрессирующих конструкций для искусственной регуляции экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса ризобий. В сборнике тезисов: VII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» // Саратов. – 2016. – С. 109.
4. Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса путем создания экспрессирующих конструкций на основе плазмиды *pJN105*. В сборнике тезисов: III Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» // Пущино. – 2016. – С. 33-34.
5. Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х. Получение штаммов клубеньковых бактерий с измененной регуляцией генов нитрогеназного комплекса. В сборнике тезисов: 21-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» // Пущино. – 2017. – С. 17.
6. Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Симахина А.С., Баймиев Ан.Х. Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса ризобий. В сборнике тезисов: I российского микробиологического конгресса // Пущино. – 2017. – С. 102-103.
7. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Акимова Е.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Баймиев Ал.Х. Бобово-ризобиальный симбиоз: что выбирают растения? В сборнике тезисов: Годичного собрания Общества физиологов растений России, научной конференции и школе молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» // Судак, Крым. – 2017. – С.21.
8. Баймиев Ан.Х., Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Баймиев Ал.Х. Горизонтальный перенос генов и нетипичные клубеньковые бактерии. В сборнике тезисов: Международной научной конференции «PLAMIC2018» // Уфа. – 2018. – С. 96.
9. Владимирова А.А., Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., Баймиев Ан.Х. Оценка конъюгативной активности у некоторых видов ризобий. В сборнике тезисов: Международной научной конференции «PLAMIC2018» // Уфа. – 2018. – С.114.
10. Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х. Модификация регуляции генов азотфиксации у клубеньковых бактерий. В сборнике тезисов: Международной научной конференции «PLAMIC2018» // Уфа. – 2018. – С. 130.