

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

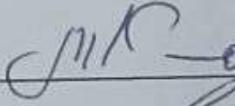
Кафедра микробиологии и физиологии растений

МЕХАНИЗМЫ КОЛОНИЗАЦИИ И АДАПТАЦИИ ПОЛИГОСТАЛЬНЫХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАСТЕНИЯМИ

Автореферат бакалаврской работы  
студента 4 курса 422 группы  
направления 06.03.01 Биология  
биологического факультета

Карлова Максима Владиславовича

Научный руководитель  
доц., канд. биол. наук, доц.  
Зав. кафедрой  
д-р биол. наук, проф.

  
09.06.25 М.Ю. Касаткин  
  
09.06.25 С.А. Степанов

Саратов 2025

**Введение.** Полигостальные бактерии — микроорганизмы, способные одинаково успешно колонизировать растения, животных и человека, становятся важным скрытым звеном пищевых инфекций. Обнаруживаясь во внутренних тканях овощей и зелени, они минуют обычные санитарные процедуры и могут передаваться человеку без видимых признаков порчи продукта [1]. Вспышка *Escherichia coli* O104:H4 в Европе (2011 г.) ярко подтвердила опасность таких «cross-kingdom» инфекций; при этом остаётся мало изученным, каким путём условно-патогенные штаммы проникают в растения, где именно локализуются и как меняют вирулентность в разных экологических условиях [2].

В обзорной части работы систематизированы сведения о полигостальности, транспатогенезе и факторах вирулентности условно-патогенных бактерий. Анализ показывает, что универсальные механизмы (секреция гидролаз, подвижность, кооперативная чувствительность) позволяют им преодолевать барьеры хозяев независимо от царства. Это определяет актуальность исследования, направленного на изучение адаптационных стратегий полигостальных штаммов и оценку риска их скрытой циркуляции в агроценозах.

В экспериментальной части смоделировано заражение проростков редиса, кресс-салата и гороха лабораторными штаммами *E. coli*, *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*. Одновременное применение селективных посевов, FISH-гибридизации, MALDI-TOF-спектрометрии и RAPD-ПЦР позволило сопоставить пути проникновения, внутритканевую локализацию, температурно-зависимые сдвиги белкового и геномного профилей и динамику вирулентных признаков. Полученные результаты расширяют представление о растениях как потенциальном резервуаре условно-патогенной микробиоты и формируют экспериментальную основу для мер, снижающих риск передачи инфекции через растительную продукцию.

Целью данного исследования является определение механизмов колонизации и адаптационной изменчивости полигостальных микроорганизмов в растениях.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Систематизировать современные сведения о полигостальных микроорганизмах — их разнообразии, механизмах колонизации растений, адаптации и транспатогенеза, а также их эпидемиологического значения при распространении пищевых инфекций.
2. На основе литературных данных подобрать микроорганизмы и растения для модельного эксперимента.
3. Оценить способность выбранных штаммов колонизировать растительные ткани при разных способах инокуляции и выявить оптимальный путь проникновения.
4. С помощью FISH-гибридизации определить внутритканевую локализацию бактерий.
5. Сравнить факторы вирулентности штаммов до и после пребывания в растении и оценить изменение их эпидемиологического потенциала.
6. Исследовать, как температурные условия влияют на белковый состав и геномный профиль бактерий, выявляя адаптационную изменчивость.

**Структура и объем работы.** Работа изложена на 51 странице машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, заключение, список использованных источников, содержащий 51 наименование.

**Научная новизна и значимость работы.** Впервые в одном эксперименте прослежен путь полигостальных штаммов *E. coli* и *B. cereus* от семени до внутренней паренхимы проростков. С помощью FISH-гибридизации показана их внутритканевая локализация, а MALDI-TOF и RAPD-ПЦР позволили связать температурно-зависимую перестройку протеома и генома. Авторская модификация подготовки срезов упростила визуализацию эндофитов, а масс-спектрометрический анализ выявил консервативные рибосомные белки и специфические маркёры холодого (семейство Csp) и теплового (IbpA/B, Hsp20) стресса.

**Основное содержание работы.** В обзоре литературы представлены понятия полигостальности и полипатогенности микроорганизмов, перечислены наиболее значимые полигостальные виды (*Pseudomonas*, *Fusarium*, энтеробактерии и др.) и детально рассмотрены их стратегии взаимодействия с растениями. Показано, что одни штаммы действуют как фитопатогены или ингибиторы роста, другие — как симбионты-стимуляторы, а многие сохраняются в нейтральном (резервуарном) состоянии, передавая инфекции по пищевой цепи. Разобраны основные пути проникновения (корень, устьица, насекомые-переносчики), механизмы внутритканевой адаптации, включая регуляцию стресс-генов и белков. Отдельный раздел посвящён эпидемиологическим последствиям: от вспышки *E. coli* O104:H4 (Европа, 2011) до случаев сальмонеллёза в США, что подчёркивает необходимость комплексного изучения транспатогенеза растений-хозяев и разработки мер по борьбе с ними.

**Материалы и методы.** В работе использовали семена и проростки редьки посевной (*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativus*) L.), кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) и гороха посевного (*Pisum sativum* L.), приобретённые в торговой сети города Саратова. Семена обрабатывали взвесью бактерий *E. coli*, *B. cereus* и *S. aureus* из коллекции кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ. После 30-минутного замачивания в бактериальной суспензии с концентрацией  $10^6$ – $10^7$  КОЕ/мл семена высевали на джутовые коврики [3]. Проростки поверхностно инокулировали теми же суспензиями штаммов, также параллельно ставили вариант со скарификацией листа для имитации природных повреждений [4].

После поверхностной стерилизации, растения гомогенизировали в 10 мл 0,9% NaCl. Стерильность контроля проверяли отпечатками и посевом последнего промывочного раствора. Гомогенаты высевали на агар Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), стафилококковый агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и агар HiCrome для обнаружения и идентификации *Bacillus* (HiMedia, Индия), инкубировали 24–48 ч при температуре плюс 37 °С [5]. Колонии пересевали на

ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), проводили биохимическими тесты и идентифицировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии [6].

Чистые культуры бактерий исследовали на гемолиз, целлюлолитическую и пектиназную активность, наличие ДНКазы, плазмокоагулазы, фитотоксичности, способности к мацерации растительные ткани, а также вызывать некроз растительных тканей. Результаты тестов сравнивали до и после пребывания штаммов в растении, что позволило оценить возможное изменение вирулентных признаков.

Для установления изменчивости белкового и геномного профилей, те же штаммы выращивали на ГРМ-агаре при температурах плюс 10 °С, плюс 28 °С, плюс 37 °С и плюс 43 °С. После выращивания, проводили RAPD-ПЦР. Ампликоны разделяли в 2% агарозном геле и визуализировали на УФ-трансиллюминаторе. Белковые профили экстрактов анализировали на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию белков осуществляли с использованием международной базы UniProt [7, 8].

Стебли редиса обрабатывали по FISH-протоколу с авторской модификацией: мягкая фиксация 4% PFA, лизоцимом 10 мг/мл (10 мин), гибридизация с TAMRA-меченым зондом LGC (гибридизационный буфер: 30% формамид, плюс 43 °С, 90 мин), двойное отмывание в буфере (Tris, NaCl и SDS) и подготовка срезов бритвенным лезвием. Далее проводили флуоресцентную микроскопию, которая показывала скопления *B. cereus* в тканях редиса [9].

**Результаты исследования.** Способ заражения оказал решающее влияние на внутреннюю колонизацию растений бактериями. При замачивании семян в бактериальной суспензии, *E. coli* и *B. cereus* без труда проникали во внутренние ткани редиса, кресс-салата и особенно гороха, сопровождая ростки уже с момента прорастания. Поверхностное опрыскивание неповреждённых листьев оказалось гораздо менее действенным: лишь горох допускал ограниченное проникновение обеих бактерий, тогда как редис и кресс-салат оставались не контаминированными. Лёгкая скарификация листовой пластинки частично упрощала проникновение бактерий: *E. coli* дополнительно обнаруживалась в

кресс-салате, но общая глубина колонизации всё-таки уступала семенному пути (Таблица 1). *S. aureus* во всех вариантах ограничивался поверхностной колонизацией и после стерилизации тканей не высевался, что связано с его неподвижностью. Как итог, ранняя контаминация семян создаёт наиболее благоприятные условия для внутреннего заселения растений, а горох среди исследованных культур проявил наибольшую восприимчивость к заражению.

Таблица 1 – Результаты проникновения полигостальных бактерий в растения

| Способ инокуляции                               | Растение | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. cereus</i> |
|---|----------|----------------|------------------|------------------|
| Инокуляция стерилизованных семян                | Редис    | +              | -                | +                |
|   | Горох    | +              | -                | +                |
|   | Салат    | +              | -                | +                |
| Инокуляция неповрежденной листовой пластинки    | Редис    | -              | -                | -                |
|   | Горох    | +              | -                | +                |
|   | Салат    | -              | -                | -                |
| Инокуляция скарифицированной листовой пластинки | Редис    | -              | -                | -                |
|   | Горох    | +              | -                | +                |
|   | Салат    | +              | -                | -                |

Поскольку микроорганизмы действительно проникли во внутренние ткани растений, следующим шагом оценили, как это пребывание в растении отражается на их вирулентности. До контакта с хозяином *B. cereus* обладал полным набором патогенных свойств – мацерацией тканей,  $\alpha$ -гемолизом и ДНКазной активностью, а *E. coli* вызывала лишь мацерацию. После выделения из проростков оба штамма полностью перестали разрушать растительные ткани, тогда как гемолитическая и ДНКазная активность *B. cereus* сохранилась неизменной. Таким образом, пребывание в растительной среде селективно нейтрализовало ферментные факторы, ответственные за разрушение растительных клеток, не затрагивая другие вирулентные функции.

Результатами RAPD-ПЦР для *E. coli* стало обнаружение устойчивого фрагмента  $\approx 700$  п.н., что указывает на сохранность ключевых регуляторных

участков генома. При температуре плюс 28 °С и плюс 37 °С к нему присоединялась дополнительная полоса  $\approx$  2600 п.н., появление этого фрагмента обосновывается как маркер оптимального метаболического статуса клетки. При тепловом стрессе (плюс 42 °С) профиль резко менялся — регистрировались новые фрагменты  $\approx$  150 и 500 п.н., характерные для активации мобильных элементов либо генов теплового шока, при температуре плюс 10 °С, напротив, заметных новообразований не выявлено.

У *B. cereus* при температуре плюс 10 °С, плюс 28 °С и плюс 37 °С постоянно присутствовали две яркие полосы  $\approx$  650 и 1000 п.н., отражающие относительную геномную стабильность. Однако уже при температуре плюс 42 °С амплификация практически не происходила: большая часть ДНК оставалась на старте геля, что указывает на сильную компактизацию нуклеоида и закрытие сайтов, узнаваемых праймерами.

Совокупность данных позволяет предположить несколько механизмов, из-за которых результаты этого метода менялись в зависимости от температуры культивирования бактерий:

1. Тепловое или холодное уплотнение ДНК под действием нуклеид-ассоциированных белков,
2. Стресс-индуцированная мобилизация транспозонов и точечные перестройки,
3. Отбор субпопуляций, лучше переносящих экстремальные условия,
4. Изменения уровня метилирования, влияющие на доступность участков для праймеров.

RAPD-анализ подтвердил, что температурные колебания вызывают у бактерий спектр генетических и эпигенетических перестроек.

Поскольку RAPD-ПЦР показала, что температурный стресс затрагивает геномный состав штаммов, следующим шагом стало выяснить, как эти изменения отражаются на уровне белкового профиля бактерий. Для этого применили MALDI-TOF масс-спектрометрию и сопоставление спектров *B. cereus* и *E. coli*, выращенных при температуре плюс 10 °С, плюс 28 °С, плюс

37 °C и плюс 42 °C.

Метод позволил зафиксировать полный набор m/z-пиков каждого штамма и вычислить зоны пересечения. У *E. coli* во всех режимах стабильно присутствовали 12 пиков, указывающих на консервативный набор рибосомных и регуляторных белков, у *B. cereus* общими оказались лишь два пика, что сразу же подчеркнуло её протеомную подвижность.

При температуре плюс 10 °C оба штамма бактерий формировали типичный холодовой профиль: у *B. cereus* резко возрастали пики 5633 и 3615 Da, указывающие на Csp-белки (CspB/CspD), у *E. coli* — 2747 Da (CspA), 2824 Da (CspB) и 5497 Da (шаперон SmpB). Эти белки стабилизируют РНК и предотвращают деградацию рибосом под влиянием температуры, обеспечивая синтез белка в условиях переохлаждения.

В температурном интервале от плюс 28 до плюс 37 °C у штаммов регистрировались наиболее сложные спектры. У *E. coli* усиливались пики 3638 Da (L29) и 5097 Da (L36) наряду с кластером 4773–4859 Da (OsmY и дегидрогеназы), а зона 6256–6317 Da отражала активацию гликолиза и цикла Кребса. У *B. cereus* доминировали пиковые сигналы 2703 Da (L28), 3168 Da (S20) и 4683 Da (L36); одновременно появлялись белки  $\sigma^B$ -регулона и белок YfkM 6334 Da, отвечающие за быструю фазу роста. Таким образом формировалось «факультативное ядро» протеома, характерное для оптимальных температур.

При температуре плюс 42 °C спектры смещались в сторону теплового ответа. У *E. coli* возрастали пики 4769 и 4859 Da (малые шапероны IbpA/B) и 9065 Da + 9536 Da (GroES и фрагмент DnaK), запускающие классический каскад GroEL/GroES–DnaK/DnaJ (рис. 8). У *B. cereus* активировались 3046 Da (Hsp20) и 7244 Da (GroES). Эти белки стабилизируют денатурирующиеся белки и повышают термотолерантность клеток.

Таким образом, при изменении температуры культивирования *E. coli* демонстрирует экономичный подход, она не формирует обширных наборов новых белков, а тонко подстраивает экспрессию уже имеющихся, что подтверждается скромным количеством уникальных пиков (47 при температуре

плюс 10 °С, 10 при плюс 28 °С, всего 2 при плюс 37 °С и снова 10 при плюс 42 °С). *B. cereus* действует иначе, каждый температурный режим сопровождается включением целых функциональных блоков протеома – от 17 до 35 специфичных сигналов. Такое масштабное переключение особенно заметно при переходах от температуры плюс 28 °С к экстремальным (плюс 10 °С и плюс 42 °С) и коррелирует с данными RAPD-ПЦР, где именно у *B. cereus* наблюдались самые выраженные сдвиги геномного профиля. Другими словами, *B. cereus* отвечает на температурный стресс глубокой перестройкой белкового состава, а *E. coli* — настройкой уже имеющихся белков (Рисунок 1).

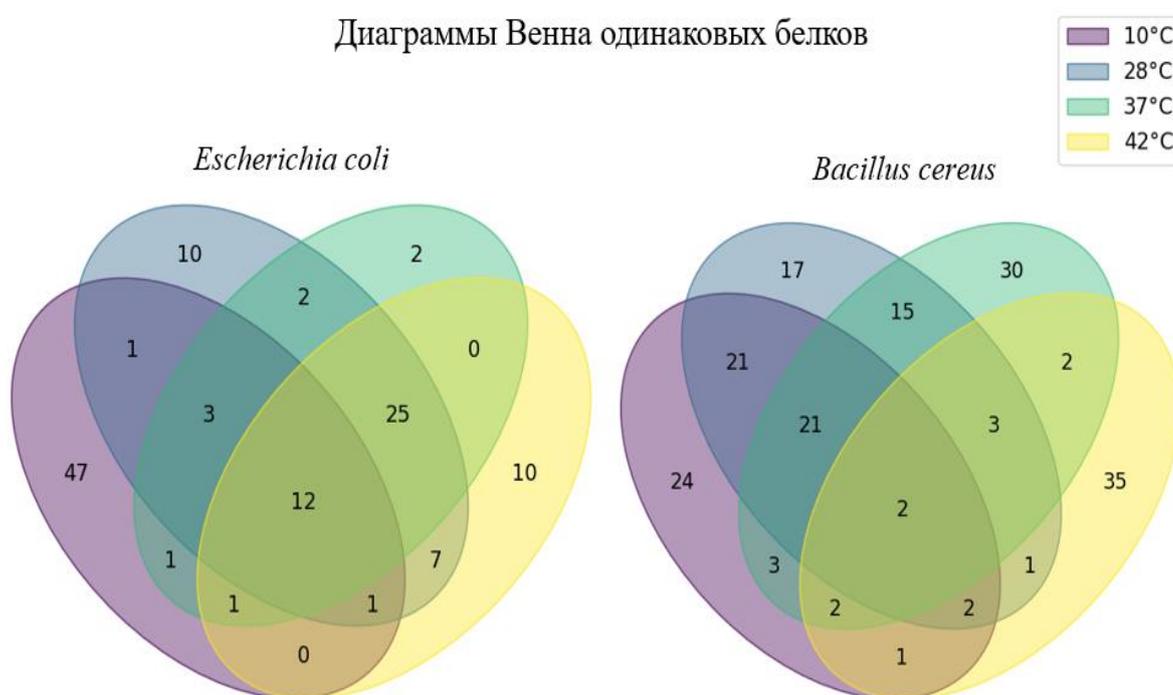


Рисунок 1 – Диаграммы Венна общих белков *E. coli*, *B. cereus*, выращенных при температурах +10 °С, +28 °С, +37 °С, +42 °С

Для определения локализации бактерий в тканях растений использовали метод FISH-гибридизации ( $\lambda_{ex} \approx 550$  нм /  $\lambda_{em} \approx 580$  нм) с TAMRA-меченым зондом LGC, специфичным для *Bacillus* spp. Микроскопия поперечных срезов стебля редиса чётко показала, что клетки *B. cereus* собираются в межклеточных апопластных пространствах паренхимы, именно там регистрировалась яркая

оранжевая и розовая флуоресценция (Рисунок 2). Центральная зона проводящего пучка (ксилема) тоже светилась, но из-за аутофлуоресценции лигнина и фенольных соединений ксилемы и флоэмы, было сложно установить флуоресценцию бактериальных клеток в этих местах. Аналогичный срез листа выявил лишь редкие точечные сигналы по паренхиме и отсутствие плотных бактериальных скоплений в центральной жилке.

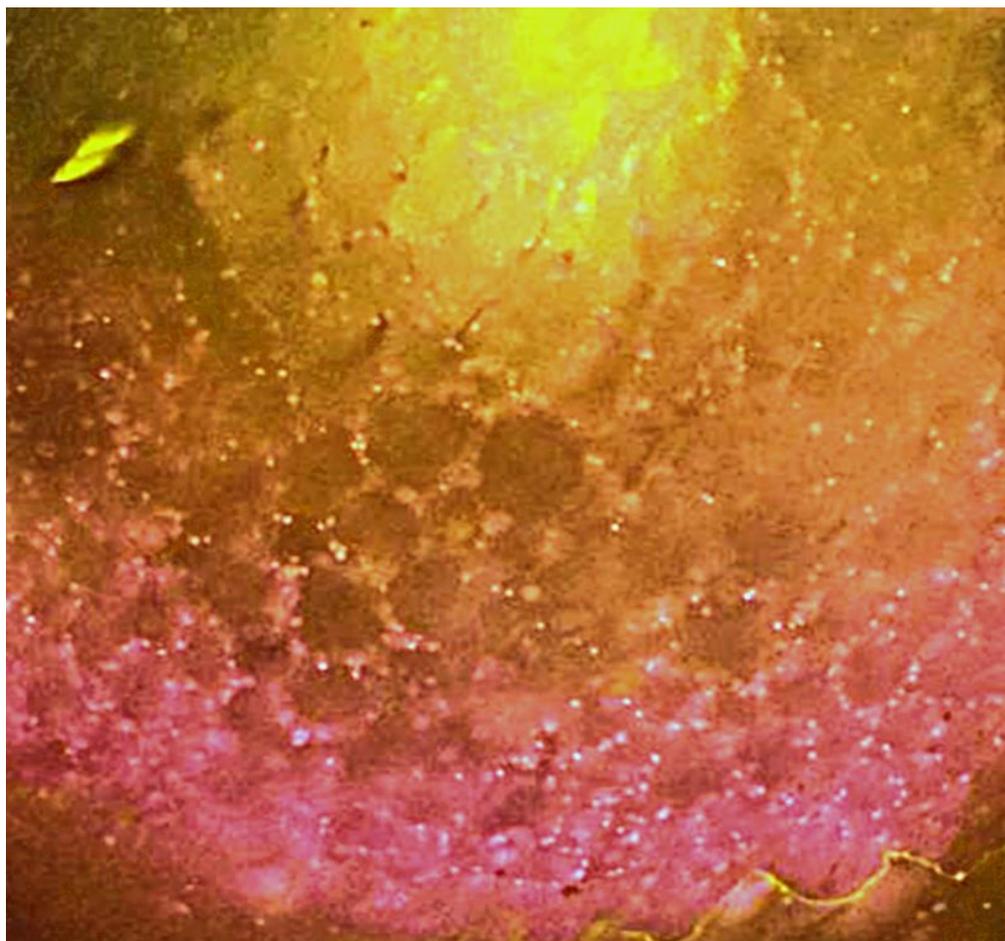


Рисунок 2 – FISH-гибридизация: поперечный срез стебля редиса с локализацией клеток *B. cereus*, увеличение 560х

**Выводы.** Анализ полученных нами в данной работе результатов позволяет сделать следующие выводы:

1. Исследование показало, что *B. cereus* и *E. coli* успешно колонизировали семена всех исследованных растений, тогда как *S. aureus* не смог проникнуть в ткани ни при одном методе контаминации. Контаминация с филосферы была успешной

только для гороха.

2. Тесты на наличие факторов патогенности показали, что *B. cereus* и *E. coli* обладают выраженными вирулентными свойствами, включая  $\alpha$ -гемолиз и способность к мацерации ткани, тогда как после инокуляции и выделения из растения, наблюдалась потеря способности мацерировать ткани, что связано с адаптацией к растительной среде.

3. Результаты RAPD-ПЦР показали чёткие температурные сдвиги у обоих штаммов. У *E. coli* при всех температурных режимах сохранялся базовый фрагмент ~700 п.н.; в диапазоне температур плюс 28–37 °С добавлялся общий полосовой сигнал 2 600 п.н., а при температуре плюс 43 °С появлялись уникальные полосы 150 и 500 п.н., отражающие тепловую перестройку генома. У *B. cereus* профили при температуре плюс 10 °С, 28 °С и 37 °С содержали стабильные фрагменты 650 и 1000 п.н., тогда как при температуре плюс 42 °С чёткие полосы исчезали, оставаясь лишь высокомолекулярное накопление у стартовой линии, что указывает на конденсацию ДНК как форму защиты от теплового стресса.

4. MALDI-TOF масс-спектрометрия показала наличие уникальных белков бактерий выращенных при разных температурах: у *E. coli* при плюс 10 °С активировались белки CspA/CspB (2747, 2824 Da), оптимальные плюс 28–37 °С усиливали рибосомные L29 и L36, тогда как плюс 42 °С выводили на максимум пики белков IbpA/B и GroES; у *B. cereus* при плюс 10 °С превосходили CspB/CspD (3619, 5634 Da), при плюс 28–37 °С доминировали рибосомные L28, S20 и белок NrdH, а при плюс 42 °С – малый шаперон Hsp20 (3046 Da) и GroES (7244 Da).

5. По результатам FISH-гибридизация установлено, что бактерии в большей степени локализуются в межклеточном пространстве.

6. Результаты исследования показали высокую адаптацию полигостальных микроорганизмов к растительным тканям и температурным стрессам.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Худоярова, Г.Н. Растения как возможные резервуары патогенных для человека бактерий / Г.Н. Худоярова, И.Д. Баротов, А.Г. Журакулов // Евразийский журнал медицинских и естественных наук. – 2023. – Т.3, №3. – С. 38–41.
- 2 The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak / H. Karch [et al.] // EMBO Mol Med. – 2012. – V. 4, №9. – P. 841-848.
- 3 Shaik, S.P. In vitro activation of seed-transmitted cultivation-recalcitrant endophytic bacteria in tomato and host-endophyte mutualism / S.P. Shaik, P. Thomas // Microorganisms. – 2019. – V. 7, №5. – P. 132.
- 4 Verma, S.K. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet / S.K. Verma, J.F. White // Journal of applied microbiology. – 2018. – V. 124, №3. – P. 764-778.
- 5 Performance yesting of *Bacillus cereus* chromogenic agar media for improved detection in milk and other food samples / E. Fuchs [et al.] // Foods. – 2022. – V. 11, №3. P. 288.
- 6 Выделение и оценка биорегуляторных свойств эндофитных бактерий / А. А. Широких [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2008. – № 3. – С. 73-80.
- 7 RAPD-PCR-based fingerprinting method as a tool for epidemiological analysis of *Trueperella pyogenes* infections / I. Stefanska [et al.] // Pathogens. 2022. – V. 11, №5. – P. 562.
- 8 URL: <http://www.uniprot.org/> (дата обращения: 18.04.25). Загл. с экрана. – Яз. англ.
- 9 Щербаков А.В. Эндофитные сообщества сфагновых мхов как источник бактерий – эффективных ассоциантов сельскохозяйственных культур: дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2013. 179 с.

Карлов