

УДК 579.22+579.81:57.083.18

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ОЦЕНКА ЭКЗОГЕННЫХ МЕТАБОЛИТОВ ЦИАНОБАКТЕРИИ “*ANABAENA*” SP. IPPAS B-2020¹

© 2024 г. Ю. В. Батаева^{a,*}, М. А. Синетова^b, Е. А. Курашов^c, Ю. В. Крылова^c,
Л. В. Коломбет^a, Л. Н. Григорян^d

^aГосударственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора,
Оболensk, 142279, Россия

^bИнститут физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276, Россия

^cИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,
п. Борок, Некоузский район, Ярославская область, 152742, Россия

^dАстраханский государственный университет им В.Н. Татищева, Астрахань, 414056, Россия

*e-mail: aveatab@mail.ru

Поступила в редакцию 09.11.2023 г.

После доработки 12.01.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2024 г.

Культура цианобактерий “*Anabaena*” sp. выделена из аллювиальных луговых почв юга России и депонирована в коллекции культур микроводорослей и цианобактерий IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под номером IPPAS B-2020. Филогенетический анализ показал, что изучаемый штамм относится к кладе, объединяющей роды *Sphaerospermopsis*, *Amphiheterocytum*, *Raphidiopsis*, *Wollea* и *Neowollea*, но не может быть в настоящее время отнесен ни к одному из них. Изучена фитотоксичность, фунгицидная и антиоксидантная активности штамма. Культура оказалась нетоксична. Водно-спиртовой экстракт и биомасса “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 полностью подавляли рост микромицетов *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* с максимальным диаметром зоны ингибирования 2.5 см. Выраженной антиоксидантной активностью обладал водный экстракт цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 – 39.3%. В составе метаболитов “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 обнаружены органические кислоты (изолимонная, молочная, уксусная), терпены, алканы, спирты и другие низкомолекулярные органические соединения. Культура “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 представляет интерес для биотехнологии как продуцент таких важных биологически активных соединений, как трибутилфосфат, D-лимонен, сквален, α-пинен.

Ключевые слова: цианобактерии, *Aphanizomenonaceae*, метаболиты, антиоксидантная активность, фунгицидная активность, экстракт, хромато-масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0026365624050026

Цианобактерии – морфологически разнообразная группа прокариот, включающая одноклеточные, трихотомные и колониальные формы. По характеру клеточной организации они соответствуют грамотрицательным бактериям и представляют самостоятельную ветвь их эволюции (Панкратова, 2010). При этом цианобактерии имеют сходство с водорослями и высшими растениями, так как осуществляют фотосинтез с выделением кислорода и содержат хлорофилл *a*, а также ряд других общих с растениями пигментов

(Пиневиц, Аверина, 2022). Понимание невозможности разграничения видов цианобактерий на основе морфологических признаков пришло с развитием технологии секвенирования ДНК, которая на сегодняшний день является необходимым инструментом для описания новых и ревизии известных видов, определения их границ, проверки традиционных видовых концепций (Komárek, 2014; Темралева и соавт., 2021; Strunecký, 2023).

Цианобактерии участвуют в почвообразовательном процессе и часто составляют основной

¹Дополнительные материалы к статье размещены по ссылке DOI: 10.31857/S0026365624050026

фототрофный компонент сообщества микроорганизмов (Бессолицына, 2012; Bataeva et al., 2017). Одновременно с фотосинтезом цианобактерии фиксируют атмосферный азот, накапливая его в почве в количестве до 25–150 кг/га в год, и тем самым вносят существенный вклад в обогащение почвы азотом, подготавливая ее для заселения другими организмами (Андреюк и соавт., 1990).

В процессе жизнедеятельности цианобактерии продуцируют комплекс биологически активных метаболитов различного состава, включая белки, углеводы, липиды, органические кислоты, стерины, изопреноиды, гормоны, фенольные соединения, витамины и др. (Singh et al., 2017; Bataeva et al., 2018; Dabravolski, Isayenkov, 2022). Среди этих веществ низкомолекулярные органические соединения (НОС) являются одними из наименее изученных. Метаболиты цианобактерий обладают антибактериальными, антиоксидантными, противогрибковыми, фитостимулирующими, аллелопатическими свойствами (Ferrari et al., 2015; Kumar et al., 2016; Bataeva et al., 2018). Поступая в корни растений, они интенсифицируют их рост, увеличивают урожайность сельскохозяйственных культур, сокращают сроки созревания, повышают питательную ценность, повышают устойчивость к неблагоприятным факторам, защищают от болезней и выполняют многие другие функции (Hirsch, 2004; Трефилова, 2008; Цавкелова, 2021; Батаева, 2022). Цианобактерии известны фитостимулирующей активностью в отношении злаковых (Prasanna et al., 2012; Fadl-Allah et al., 2011), бобовых (Панкратова и соавт., 2008; Трефилова, Патрушева, 2009; патент № 2734987), овощных (патент № 2634387; Батаева и соавт., 2020; Батаева, Григорян, 2022) и масличных культур (патент № 2734987; Батаева и соавт., 2022). Известен антагонизм цианобактерий к грибам, вызывающим болезни растений. Например, цианобактерии *Lyngbya majuscula*, *Nostoc muscorum*, *Nostoc palludosum*, *Anabaena variabilis*, *Anabaena cylindrica*, *Scytonema ocellatum*, *Phormidium tenue*, *Nodularia harveyana*, *Fischerella muscicola*, *Tolypothrix* sp. проявляли ингибирующую активность в отношении представителей рода *Fusarium* и других фитопатогенов (Kajiyma et al., 1998; Ramamurthy, 2012; Гольдин, 2013).

Высокая пластичность метаболизма и адаптация цианобактерий на таксономическом и физиолого-биохимическом уровнях организации обуславливает возможность разработки на их основе новых агробiotехнологических методов и ценных препаратов (Lacap-Bugler et al., 2017; Домрачева и соавт., 2021).

Таким образом, целью работы стал поиск почвенных цианобактерий, имеющих биотехнологический потенциал. В задачи работы входило выделение и идентификация нового штамма, а также исследование его фитотоксичности, фунгицидной, антиоксидантной активностей и состава экзогенных метаболитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение культуры цианобактерий. Цианобактериальный штамм изолировали из образцов аллювиальных луговых почв ясеневое леса Астраханской области, на которых визуальным способом не было отмечено биокорков. Сначала получали накопительную культуру на среде BG-11 (Гайсина и соавт., 2008), затем альгологически чистую культуру выделяли методом кратного разведения, поочередно пересаживая необходимые колонии на жидкую и плотную среду BG-11. Полученную культуру цианобактерий депонировали в коллекции культур микроводорослей и цианобактерий IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под номером IPPAS B-2020.

Культивирование проводили в люминесцентных при освещении 600–700 лк при температуре 22–25°C. О росте цианобактерий судили по изменению цвета, образованию пленок, обрастаний, выделению газа. Микроскопирование клеток цианобактерий осуществляли с использованием микроскопа Axio Imager D1 с камерой AxioCam MRc (“Carl Zeiss”, Йена, Германия). Для получения достаточного количества биомассы культуру IPPAS B-2020 выращивали в течение 30 сут на среде BG-11, после чего использовали для экспериментальной работы и получения экстрактов.

Идентификация штамма IPPAS B-2020. Идентификацию по фенотипическим признакам проводили по определителю (Komárek, 2013).

Для молекулярно-генетической идентификации ДНК цианобактерий выделяли фенол-хлороформным методом (Mironov, Los, 2015). Последовательность 16S рРНК амплифицировали с помощью универсальных бактериальных праймеров 16S_F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Eden et al., 1991) и 16S_R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Takeuchi et al., 1993). Последовательность 16S–23S ITS региона амплифицировали с помощью универсальных бактериальных праймеров ITS_F 5'-TGACACACCGCCCGTC-3' и ITS_R 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3' (Iteman et al., 2000). Полученные продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) разделяли электрофорезом в агарозном геле, вырезали участки геля, содержащие продукт ПЦР, и выделяли ДНК из геля набором GenJet Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, Уолтем, США), используя стандартный протокол производителя. Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали по Сенгеру (“Евроген”, Москва, Россия) с помощью праймеров, использованных для ПЦР и дополнительных праймеров для 16S рРНК CYA106F 5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3' CYA781R 5'-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3' (Nübel et al., 1997). Полученные при секвенировании

последовательности собирали в единый контиг 16S рРНК-ITS с помощью программного обеспечения SeqMan Pro Lasergene v. 12.3.1 (“DNASTar Inc.”, Мэдисон, Висконсин, США). Полученный контиг содержал 1969 нуклеотидов и был депонирован в базу данных GenBank NCBI под номером OR712118.

Для поиска гомологичных последовательностей использовали первые 1475 нуклеотидов полученной последовательности OR712118, кодирующие 16S рРНК. Поиск проводили в базе данных Genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью алгоритма Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для дальнейшего анализа отбирали последовательности культивируемых штаммов цианобактерий с покрытием не менее 95% и идентичностью более 95.6%. Кроме того, к анализу были добавлены последовательности референсных штаммов и штаммов с проанализированным таксономическим положением, принадлежащих к родам сем. *Aphanizomenonaceae*, пор. *Nostocales* (Strunecký et al., 2023). В качестве внешней группы использовали последовательность 16S рРНК *Gloeobacter violaceae* PCC 7421. Список использованных для анализа последовательностей приведен в таблице S1.

Отобранные 142 последовательности выравнивали с помощью алгоритма ClustalW в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) и затем редактировали вручную. После выравнивания длина анализируемых последовательностей равнялась 1036 п.н.

Филогенетические деревья строили в программе MEGA X с помощью двух алгоритмов, Neighbor-Joining и Maximum Likelihood. В качестве оптимальной модели нуклеотидных замен в первом случае была выбрана модель K2+G (двухпараметрическая модель Кимуры с гамма-распределением), во втором — модель K2+G+I (двухпараметрическая модель Кимуры с гамма-распределением и инвариантными сайтами). Статистическую достоверность кластеров оценивали с помощью бутстреп-анализа (1000 реплик).

Генетические дистанции p-distance рассчитывали в программе MEGA X. Генетическое сходство рассчитывали по формуле $100 \times [1 - (p\text{-distance})]$.

Получение экстрактов и фракции культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020. Для получения водных и водно-спиртовых экстрактов образец сырой биомассы цианобактерий (пленки в 30-суточной культуре) высушивали при температуре 37°C в сушильном шкафу (ШС-8001 СПУ) в течение 3 сут до постоянного веса. Абсолютно сухую биомассу измельчали в ступке до размера частиц 1–2 мм. Для получения водно-спиртового экстракта 10 мг измельченной биомассы заливали 1 мл раствора дистиллированной воды и этанола (50/50; 20/80; 80/20). Водный экстракт получали, смешивая сухую биомассу с дистиллированной водой в аналогичном соотношении. Спустя 1 ч экстракты тщательно отфильтровывали через мембранный фильтр.

Фракцию получали методом колоночной хроматографии, пропуская водно-спиртовой экстракт (50/50) цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 через колонку с силикагелем (КСМГ, фракция 0.125–0.20 мм) высотой 14 см. Колонку предварительно заливали элюентной водно-спиртовой системой 20/80. Через 90 мин получили одну фракцию лимонного цвета. Высушенную фракцию массой 5 мг разводили 5 мл стерильной дистиллированной воды и использовали для опытов.

Для выделения экзогенных метаболитов (НОС) “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 методом газовой хромато-масс-спектрометрии получали гексановые экстракты. Для этого 250 мл культуры (3 г сырой биомассы/100 мл среды) отфильтровывали через нейлоновый фильтр (диаметр пор 200 мкм) для освобождения от пленок и экстрагировали 5 мл гексана (Батаева и соавт., 2014). Жидкость помещали в делительную воронку, добавляли гексан и взбалтывали в течение 3 мин. Затем отстаивали, жидкость утилизировали, а гексан помещали во флаконы из темного стекла и сохраняли в морозильной камере при –18°C до проведения хромато-масс-спектрометрического исследования.

Определение фитотоксичности. Фитотоксичность изучали на семенах кресс-салата (*Lepidium sativum*) сорта Дукал согласно ГОСТ 12038-84. Для эксперимента семена помещали во влажные камеры — стерильные чашки Петри с фильтровальной бумагой, предварительно простерилизовав их 70% этанолом в течение 3–5 мин. В каждую камеру помещали 50 семян, которые увлажняли суспензией с 10 мл стерильной дистиллированной воды и 0.3 г сырой биомассы цианобактерий. Семена, обработанные суспензией и дистиллированной водой (контроль) в трех повторностях, проращивали в течение 3 сут при дневном освещении и температуре 25°C. Наличие ростстимулирующего, ингибирующего или нейтрального эффекта определяли, сравнивая всхожесть семян, длину корня и побега растений в контрольном и опытном вариантах (ГОСТ 12038-84).

Определение фунгицидной активности. Фунгицидную активность определяли методом диффузии в агар (МУК 4.2.1890-04). В качестве тест-объектов использовали грибы рода *Fusarium* (*F. sporotrichioides*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*), которые являются фитопатогенными и способствуют появлению корневых гнилей у растений, что снижает рост и урожайность растений и ведет к их гибели. Грибы предоставлены лабораторией технологии микробных препаратов ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии.

В опыте использовали сырую биомассу (пленки в 30-суточной культуре), водно-спиртовой экстракт (50/50) и фракцию водно-спиртового экстракта (50/50) культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020. В водную суспензию с макро- и микроконидиями

микромицетов с титром $0.3\text{--}0.7 \times 10^7$ спор/мл добавляли питательную среду (бобовый агар в соотношении 1 : 10) и разливали по чашкам. В застывшем агаре каждой чашки делали лунки диаметром 5 мм, которые заполняли исследуемым материалом. В центральной лунке помещали контроль в количестве 100 мкл. В экспериментах с биомассой цианобактерий контролем служила дистиллированная вода; при исследовании водно-спиртовых экстрактов и фракции контролем был водно-спиртовой раствор (50 : 50).

На 3 сут проводили измерение диаметра зоны ингибирования (ДЗИ) роста культур, отмечая фунгистатическую активность в последующие 2 сут по зарастанию зоны подавления, и выявляли фунгицидное действие по отсутствию роста тест-культур. Пролонгированное действие препаратов оценивали по зоне фунгицидного подавления роста тест-культур в последующие 3–4 недели. Морфологические изменения, происходящие с фитопатогенными грибами под воздействием цианобактерий, изучали с помощью микроскопа Микмед 5 с визуализатором VidCap.

Определение антиоксидантной активности. В экспериментах по определению антиоксидантной активности использовали суспензию клеток “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 (3 г сырой биомассы/100 мл питательной среды), водный и водно-спиртовой экстракты (50/50). Применяли метод колориметрии свободных радикалов, основанный на реакции DPPH (ДФПГ, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, $M = 394.33$), растворенного в метаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме $\text{DPPH}^* + \text{АН} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^*$ (Molyneux, 2004). В результате восстановления ДФПГ антиоксидантом снижается интенсивность пурпурно-синей окраски ДФПГ в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 517 нм методом спектрофотометрии. К 1480 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл исследуемого образца. Так как с такой концентрацией образцов активность была недостаточно высокой, увеличили соотношение образца к оксиданту, уменьшая при этом объем растворителя – спирта. К 1400 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 100 мкл исследуемого образца. В качестве контроля антиоксидантной активности выбрали аскорбиновую кислоту (Астафьева и соавт., 2021). К 1480 мкл этилового спирта 96% добавляли 500 мкл раствора ДФПГ и 20 мкл раствора аскорбиновой кислоты (1 мг/мл). Аналогично делали раствор со 100 мкл кислоты. Смесь энергично встряхивали и оставляли на 60 мин. Исследования проводили в трех повторностях. Антиоксидантную активность рассчитывали по формуле: $\text{АОА} = (\text{D}_\text{к} - \text{D}_\text{оп} / \text{D}_\text{к}) \times 100\%$, где $\text{D}_\text{к}$, $\text{D}_\text{оп}$ – оптическая плотность (среднее значение) в контрольном и опытном образцах соответственно (Хасанов и соавт., 2004).

Определение синтезируемых органических кислот “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение органических кислот проводили в водно-спиртовых экстрактах (80/20, 20/80) культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 с использованием анионообменных колонок и супрессионной системы с кондуктометрическим детектированием. Для определения органических кислот использовали жидкостной хроматограф Waters Alliance 2695 с диодно-матричным детектором Waters 2996 при длине волны 220 нм. Концентрацию обнаруженных кислот рассчитывали автоматически, сравнивая со стандартами.

Определение компонентного состава метаболитов штамма IPPAS B-2020 методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). Качественный и количественный состав НОС гексановых экстрактов определяли на газовом хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMSQP2010 Ultra. Использовали неполярную колонку МТХ-1; $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$. В качестве газа-носителя служил гелий. Масс-спектры снимали в режиме сканирования по полному диапазону масс ($30\text{--}1090 \text{ m/z}$) в программированном режиме температур ($35^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 2°C/мин до $60^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 2°C/мин до $80^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 4°C/мин до $120^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 5°C/мин до $150^\circ\text{C} - 3 \text{ мин}$, 15°C/мин до $240^\circ\text{C} - 10 \text{ мин}$) с последующей пошаговой обработкой хроматограмм.

Идентификацию выявленных НОС проводили с использованием библиотек масс-спектров NIST-2014 и Wiley (Wiley et al., 2011). Количественный анализ выполняли с использованием бензофенона в качестве внутреннего стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое описание штамма IPPAS B-2020. Трихомы штамма IPPAS B-2020 сине-зеленые, изополярные, прямые, перешнурованные у поперечных перегородок, одиночные, свободно плавающие или образующие небольшие сгустки, погруженные в экзополисахаридный матрикс (рис. 1а). На твердой среде штамм не образует колонии, а обрастает всю поверхность агара. Клетки коротко-бочонкообразные, шириной $5.0\text{--}6.5 \text{ мкм}$, длиной $3.0\text{--}6.0 \text{ мкм}$ (рис. 1а–1г), в некоторых клетках заметны газовые вакуоли (рис. 1г). Трихомы слегка суженные к концу, апикальные клетки закругленные конические (рис. 1б, 1в). Гетероцисты преимущественно интеркалярные, редко апикальные, шаровидные, $5\text{--}7 \text{ мкм}$ в диаметре (рис. 1а–1в). Акинеты не обнаружены. Размножение происходит путем разрывов трихомов. Важно также отметить, что, хотя штамм выделен из почвы, присутствие газовых вакуолей свидетельствует

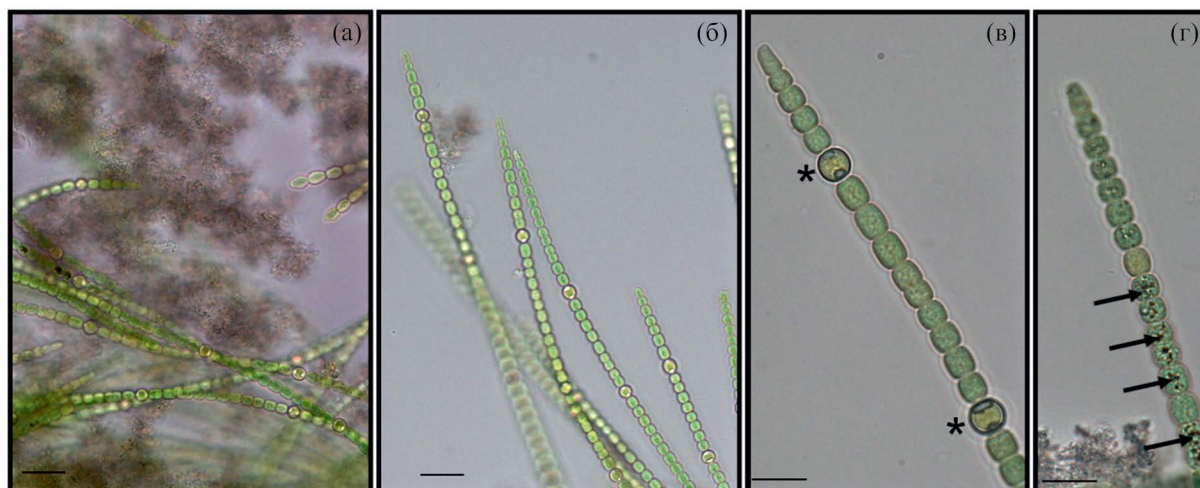


Рис. 1. Трихомы “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 в световом микроскопе: а — общий вид трихомов, окруженных окрашенным экзополисахаридным матрикосом; б, в — трихомы с интеркалярными гетероцистами и закругленными конечными клетками; трихом с клетками, содержащими газовые вакуоли, и развивающейся гетероцистой; зрелые гетероцисты отмечены звездочками; г — стрелки указывают на газовые вакуоли. Масштабная линейка: а, б — 10 мкм; в, г — 20 мкм.

о его планктонном происхождении. Территория отбора проб в весенний период подвергалась затоплению паводковыми водами, поэтому в почве могли остаться планктонные виды. По комплексу фенотипических признаков выделенный штамм был определен как *Sphaerospermum aphanizomenoides* (Komárek, 2013). Однако ключевым признаком семейства *Nostocaceae* Komárek (2013) считает морфологическое строение и положение акинет, а у изучаемого штамма они отсутствовали. Поэтому однозначное определение штамма по этому ключу не было возможным.

Филогенетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, показал, что штамм IPPAS образует кластер с высокой бутстреп-поддержкой со штаммами BCCUSP55 и PMC 306.07, идентифицированными как *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Lorenzi et al., 2022) и *Anabaena sphaerica* (Duval et al., 2018) соответственно (кластер IB на рис. 2).

Штамм *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 был изолирован из водохранилища Жуказиньо (Jucazinho) в семиаридном регионе Бразилии (Lorenzi et al., 2022). Морфологическое описание этого штамма или его изображение найти не удалось. Штамм *Anabaena sphaerica* PMC 306.07 был изолирован из пруда в деревне Дужани (Ducjani) на острове Майотта; по морфологии он сходен с изучаемым штаммом IPPAS B-2020, за исключением того, что у штамма PMC 306.07 наблюдали развитие 1–2 округлых или овальных акинет по обе стороны от гетероцист (Duval et al., 2018). Сходство между последовательностями 16S рРНК в этом кластере

составляет 99.6–100%, следовательно, эти штаммы определенно принадлежат к одному роду и, возможно, также к одному виду. Кластер IB не кластеризуется ни с одним из валидно описанных родов, однако он принадлежит большой кладе, обозначенной на рис. 2 как клада I. В эту кладу входят представители сем. *Aphanizomenonaceae* пор. *Nostocales*, принадлежащие родам *Sphaerospermopsis* Zapomelová et al., *Amphiheterocytum* Sant'Anna et al., *Raphidiopsis* F.E.Fritsch and M.F.Rich (включая *Cylindrospermopsis* G.Seenayya and N.Subba Raju) (Aguilera et al., 2018), *Wolleea* Bornet and Flahault, *Neowolleea* Tawong, а также штаммы, идентифицированные как *Anabaena* Bory ex Bornet and Flahault и два симбиотических штамма, ошибочно обозначенных как “*Nostoc*”. Учитывая, что штаммы, которые, согласно исследованиям Kozlíková-Zapomelová et al. (2016), относятся к типовому виду рода *Anabaena* — *A. oscillarioides* Bory ex Bornet and Flahault, находятся в далеко отстоящей кладе (рис.2), ни один из представителей клады I не принадлежит к роду *Anabaena sensu stricto*. Штаммы клады I, идентифицированные как различные виды рода *Anabaena*, принадлежат либо к одному из вышеперечисленных родов клады I, либо к новым, еще не описанным родам.

Представители родов *Sphaerospermopsis*, *Amphiheterocytum*, *Raphidiopsis* и *Neowolleea* и некоторые штаммы, идентифицированные как *Wolleea*, образуют внутри клады I кластер IA с относительно высокой бутстреп-поддержкой (67), что совпадает с данными предыдущих работ (Tawong et al., 2019; Wang et al., 2023). Важно отметить, что часть штаммов, идентифицированных как *Sphaerospermopsis*,

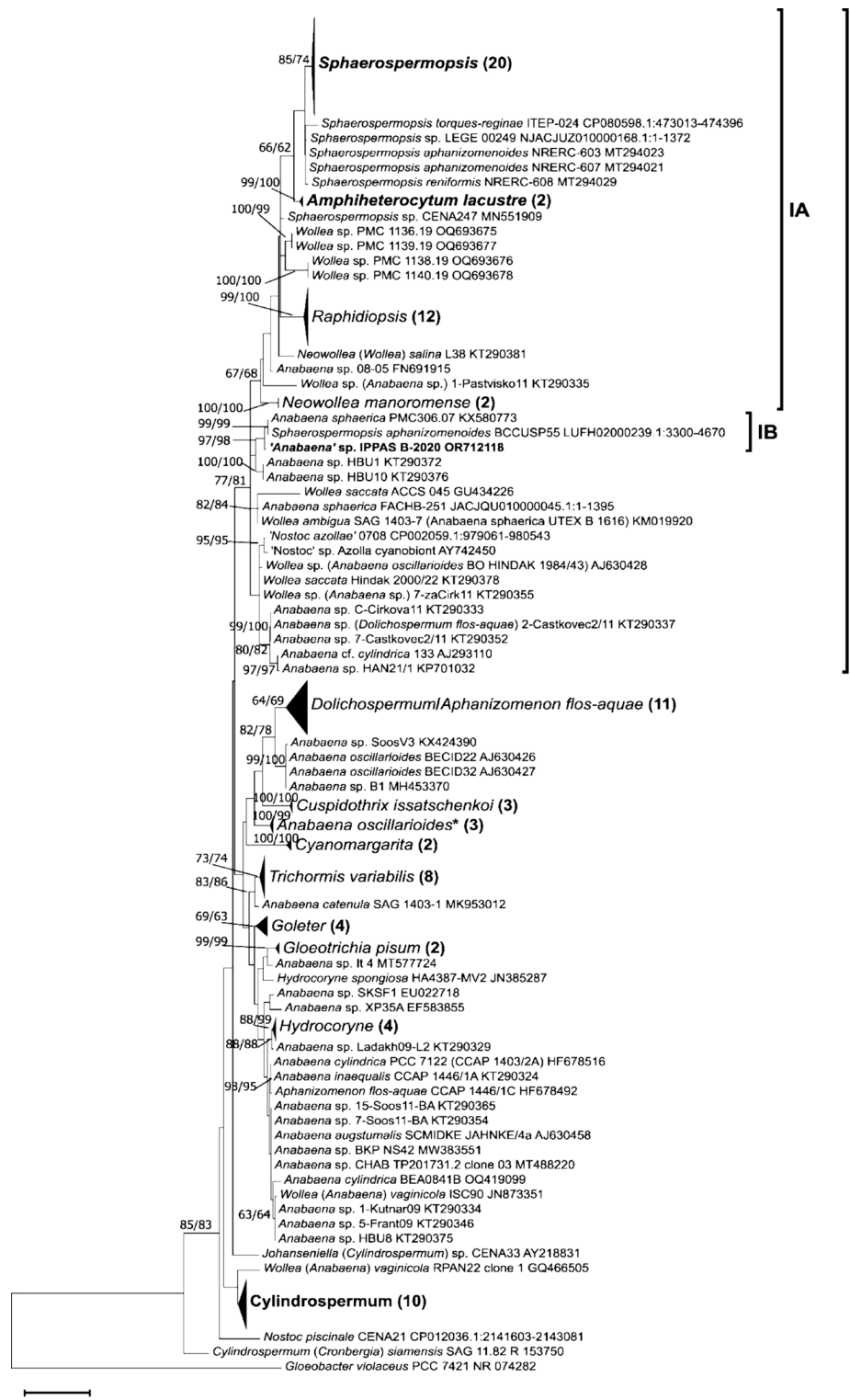


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (1036 п.н.) представителей сем. *Aphaniizomenonaceae*, пор. *Nostocales*. Дерево построено методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с указанием значений поддержки бутстрепа при данном анализе и при анализе методом присоединения соседей (Neighbor Joining, NJ) как ML/NJ. Показаны только значения >60%. Последовательность исследуемого штамма выделена жирным шрифтом. Последовательности, принадлежащие одному роду, объединены в кластеры, обозначенные названием соответствующего рода, в скобках указано количество последовательностей в таком кластере. Звездочкой отмечен кластер, образованный штаммами, которые относятся к типовому виду рода *Anabaena*, *A. oscillarioides* Bory de Saint-Vincent and Flahault, согласно Kozlíková-Zapomělová et al. (2016).

Таблица 1. Фенологические показатели кресс-салата после обработки культурой “*Anabaena*” sp.

Вариант эксперимента	Всхожесть семян, %	Длина корня, мм (ср.)	Длина побега, мм (ср.)
Контроль	85.7 ± 1.2	25.7 ± 1.4	13.4 ± 0.6
“ <i>Anabaena</i> ” sp.	98.7 ± 1.2	34.6 ± 0.4	17.1 ± 0.2

на нашем филогенетическом дереве оказались за пределами основной клады *Sphaerospermopsis* и, видимо, нуждаются в таксономической ревизии. Штаммы рода *Neowollea* не образовали единого кластера с высокой бутстреп-поддержкой на нашем дереве. Штаммы клады I, определенные как *Wollea*, далеко отстоят от других штаммов рода *Wollea*, отнесенных к этому роду согласно Kozlíková-Zapomělová et al. (2016) и образующих еще две независимые клады на нашем филогенетическом дереве (рис. 2). Таким образом, род *Wollea* в современном понимании является полифилетическим, нуждается в пересмотре и, прежде всего, в определении штаммов, действительно относящихся к типовому виду рода *W. saccata*.

Кластер IB с изучаемым штаммом IPPAS B-2020 находится за пределами кластера IA и не объединяется с ним, и, таким образом, не может принадлежать ни к одному из родов кластера IA, включая *Sphaerospermopsis* и *Neowollea*, с которыми представители кластера IB имеют определенное морфологическое сходство. Генетическое сходство между кластером IB и родами кластера IA составляет <98% (95.8–97.9%), что у представителей порядка *Nostocales* соответствует разным родам (Kaštovský et al., 2014).

Хотя клада IB не образует кластера с высокой бутстреп-поддержкой ни с какими другими штаммами клады I, она имеет довольно высокое (>98%) сходство со штаммами *Anabaena* sp. HBU1, *Anabaena* sp. HBU10, *Anabaena sphaerica* FACHB-251 и *Wollea ambigua* SAG 1403-7, а также пограничные значения сходства 97.9–98.1% со штаммами *Wollea saccata* Hindak 2000/22 и *Wollea* sp. 7-zaCirk11. Учитывая это высокое сходство, нельзя исключать отнесение клады IB к роду *Wollea*, но для решения этого вопроса необходимо прежде всего определить границы этого рода. Против такого объединения говорит тот факт, что штаммы клады IB не образуют макроколонию, но важность этого признака как морфологического маркера уже вызвала сомнения (Kozlíková-Zapomělová et al., 2016).

Таким образом, изучаемый штамм в настоящее время не может быть отнесен ни к одному из валидно описанных родов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы прояснить, являются ли штаммы кластера IB, включая изучаемый штамм IPPAS B-2020, представителями нового рода или все-таки принадлежат к одному из описанных родов, например, роду *Wollea*. До прояснения этого вопроса

мы решили обозначить штамм IPPAS B-2020 как “*Anabaena*” sp. *sensu lato*.

Фитотоксичность. В результате обработки полученных данных, культура “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 оказалась нетоксичной для семян кресс-салата. Обработка семян клетками цианобактерий повышала всхожесть на 13%, длину корневой части проростка – на 34%, длину побега – на 27% (табл. 1).

Значения не оказались статистически значимыми, но выявлена тенденция к увеличению показателей при бактерилизации цианобактериями. “*Anabaena*” sp. относится к азотфиксирующим гетероцистным формам цианобактерий, играющих большую экологическую роль в почвах и оказывающих активное влияние на растения (Панкратова и соавт., 2008). Также известно, что рост-стимулирующий эффект цианобактерий связан с наличием в них ауксино- и гиббериллиноподобных веществ (Цавкелова, 2021).

Фунгицидная активность. При исследовании фунгицидной активности на 3–5 сут наблюдали полное визуальное подавление роста фитопатогенного гриба *F. culmorum* биомассой и водно-спиртовым экстрактом штамма IPPAS B-2020 (рис. 3). Также полное ингибирование произошло при воздействии “*Anabaena*” sp. на рост *F. sporotrichioides* в вариантах опыта с сырой биомассой и водно-спиртовым экстрактом “*Anabaena*” sp. (табл. 2).

Одновременно наблюдали визуальное подавление роста фитопатогенного гриба *F. roae* водно-спиртовым экстрактом и фракцией водно-спиртового экстракта IPPAS B-2020. Микроскопирование показало, что в условиях непосредственного взаимодействия с экстрактом и фракцией формирование мицелия тест-грибов значительно замедлялось по сравнению с контролем.

На рост гриба *F. graminearum* оказал наибольший ингибирующий эффект водно-спиртовой экстракт с полной задержкой роста 2.1 см. Фракция “*Anabaena*” sp. не оказала подавляющего действия на *F. graminearum*. Аналогичное антифузариозное действие гетероцистных цианобактерий наблюдали в ризосфере и почве (Домрачева и соавт., 2009).

В результате установлено, что водно-спиртовой экстракт штамма цианобактерий IPPAS B-2020 ингибировал рост всех исследуемых фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*. Водно-спиртовой экстракт и биомасса IPPAS B-2020 оказали полное подавление грибов *F. culmorum*, *F. graminearum*,

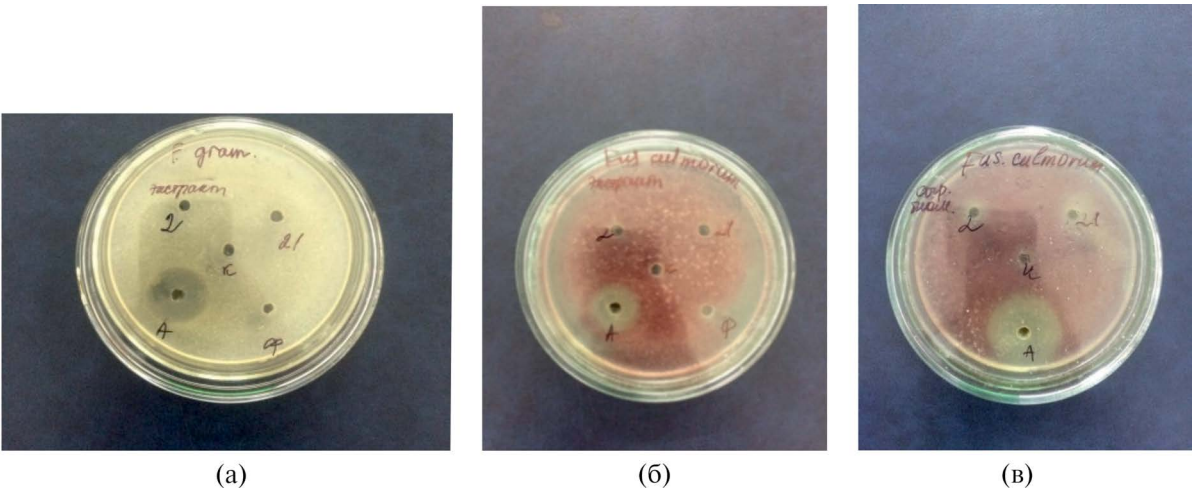


Рис. 3. Влияние цианобактерии “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 на рост микромицетов: а – *F. graminearum* – с водно-спиртовым экстрактом; б – *F. culmorum* – с водно-спиртовым экстрактом; в – *F. culmorum* – с сырой биомассой. Подписи на чашках: А – “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020; Ф – фракция; 2 и 21 – номера культур цианобактерий, взятые для сравнения.

Таблица 2. Фунгицидная активность “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 по отношению к микромицетам рода *Fusarium*

Объект исследования	Диаметр зоны ингибирования, см			
	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
Сырая биомасса	2.4 ± 0.25	0	1.9 ± 3.11*	2.1 ± 2.10
Водно-спиртовой экстракт, 50/50	2.3 ± 1.00	1.6 ± 1.19*	2.1 ± 1.47	2.5 ± 2.96
Фракция водно-спиртового экстракта	0	1.8 ± 2.50*	0	0

*Зона неполного ингибирования роста гриба.

F. sporotrichioides. Фракция водно-спиртового экстракта цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 оказала фунгистатическое действие только на *F. poae*. Таким образом, наибольшую фунгицидную активность “*Anabaena*” sp. проявила по отношению к *F. sporotrichioides* и *F. culmorum*.

Исследование антиоксидантной активности “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020. Выраженной антиоксидантной активностью обладал водный экстракт цианобактерий “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 в объеме 20 мкл – 39.3% и 100 мкл – 28.7% (табл. 3).

В объеме 100 мкл высокой активностью обладал также водно-спиртовой экстракт – 27.7%. В остальных вариантах антиоксидантная активность была ниже контрольной на 6.3–17.2%. В литературе часто встречается информация о цианобактериях – продуцентах фенольных соединений с антиоксидантными свойствами (Ferrari et al., 2015). *Arthrospira platensis*, *Nostoc muscorum*, *Phormidium foveolarum* продуцировали такие антиоксиданты, как пролин,

аскорбат, цистеин и небелковые тиолы (Kumar et al., 2016). Поэтому мы исследовали состав органических кислот и НОС культуры IPPAS B-2020.

Исследование состава органических кислот цианобактерий. Исследование водно-спиртовых

Таблица 3. Антиоксидантная активность “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020

Вариант опыта	Антиоксидантная активность, %	
	20 мкл	100 мкл
Контроль – аскорбиновая кислота	12.5 ± 0.02	25.0 ± 0.11
Суспензия	6.2 ± 0.01	7.8 ± 0.09
Водный экстракт	39.3 ± 0.94	28.7 ± 0.06
Водно-спиртовой экстракт, 50/50	3.2 ± 0.02	27.7 ± 0.01

экстрактов (80/20, 20/80) культуры “*Anabaena*” sp. IPPAS В-2020 методом ВЭЖХ показало наличие органических кислот – изолимонной, молочной, уксусной.

В водно-спиртовом экстракте (80/20) “*Anabaena*” sp. обнаружена изолимонная кислота в количестве 0.439 г/л. В экстракте 20/80 обнаружены молочная (0.207 г/л) и уксусная кислоты (0.270 г/л). Молочная и уксусная кислоты являются активными противомикробными и антиоксидантными агентами (Goldwhite, 2003; Lamb et al., 2006).

Исследование экзогенных метаболитов “*Anabaena*” sp. IPPAS В-2020. Вторичные метаболиты

изучены у представителей порядков *Oscillatoriales* (49%), *Nostocales* (26%), *Chroococcales* (16%), *Pleurocapsales* (6%) и *Stigonematales* (4%) (Gerwick et al., 2008). Это различные соединения с цитотоксическими (41% от общего количества найденных веществ), противоопухолевыми (13%), противовирусными (4%), противомикробными (12%), а также противогрибковыми, гербицидными, антиоксидантными, фитостимулирующими свойствами (Burja et al., 2001; Gerwick et al., 2008; Verma et al., 2022).

В составе вторичных метаболитов штамма IPPAS В-2020 обнаружили 61 НОС, из которых

Таблица 4. Состав экзогенных метаболитов “*Anabaena*” sp. IPPAS В-2020

Вещество	Формула	RT	RI	C	%
Гексан-2-он	$C_6H_{12}O$	3.21	799	0.031	0.51
Октан	C_8H_{18}	3.33	800	0.142	2.34
Гексан-2-ол	$C_6H_{14}O$	3.41	812	0.018	0.29
Этилциклогексан	C_8H_{16}	3.94	831	0.005	0.09
1,2-ксилен	C_8H_{10}	4.90	867	0.032	0.52
1,3-ксилен	C_8H_{10}	5.61	893	0.176	2.89
Нонан	C_9H_{20}	6.01	900	0.021	0.34
2,6,6-триметилбицикло-(3,1,1)гепт-2-ен (α -пинен)	$C_{10}H_{16}$	7.13	929	0.081	1.33
1-этил-3-метилбензен	C_9H_{12}	8.40	956	0.034	0.57
2,6-диметилгептан-4-он	$C_9H_{18}O$	9.06	970	0.025	0.40
1-этил-2-метилбензен	C_9H_{12}	9.89	988	0.042	0.70
Анилин	C_6H_7N	10.12	993	0.043	0.71
2-метилоктан-4-ол	$C_9H_{20}O$	10.45	999	0.142	2.33
Декан	$C_{10}H_{22}$	10.60	1000	0.057	0.94
1-метил-4-пропан-2-илбензен	$C_{10}H_{14}$	11.64	1020	0.071	1.18
(4R)-1-метил-4-проп-1-ен-2-илциклогексен	$C_{10}H_{16}$	11.84	1023	0.682	11.23
Бензойная кислота	$C_7H_6O_2$	23.22	1182	0.194	3.19
Додекан	$C_{12}H_{26}$	24.78	1200	0.104	1.71
2,6,8-триметилдекан	$C_{13}H_{28}$	32.58	1302	0.017	0.29
Додец-1-ен	$C_{12}H_{24}$	37.85	1395	0.026	0.43
Тетрадекан	$C_{14}H_{30}$	38.23	1400	0.177	2.92
Октилциклогексан	$C_{14}H_{28}$	39.82	1442	0.033	0.55
3-метилтетрадекан	$C_{15}H_{32}$	39.96	1445	0.039	0.64
Пентадекан	$C_{15}H_{32}$	42.19	1500	0.022	0.36
(2S,3S,4R,5S)-2-[(1R)-1,2-диметоксиэтил]-3,4,5-триметоксиоксолан	$C_{11}H_{22}O_6$	42.49	1508	0.016	0.26
N',P-ди-изопропил-N-T-бутилфосфоник диамид	$C_{10}H_{25}N_2OP$	42.49	1508	0.015	0.25
2,6,11,15-тетраметилгексадекан	$C_{20}H_{42}$	45.33	1573	0.009	0.15
2-метилгексадекан-1-ол	$C_{17}H_{36}O$	46.29	1595	0.050	0.81
Гексадекан	$C_{16}H_{34}$	46.57	1600	0.068	1.12
3,3-Диэтилтридекан	$C_{17}H_{36}$	48.17	1651	0.031	0.50
Трибутилфосфат	$C_{12}H_{27}O_4P$	48.50	1661	0.018	0.29
Гептадекан	$C_{17}H_{36}$	49.83	1700	0.043	0.70
Октадекан	$C_{18}H_{38}$	52.93	1800	0.085	1.39
Нонадекан	$C_{19}H_{40}$	55.39	1900	0.071	1.17

Окончание таблицы 4

Вещество	Формула	RT	RI	C	%
7,9-Ди-трет-бутил-1-оксаспиро[4.5]дека-6,9-диен-2,8-дион	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	55.59	1919	0.026	0.43
2-метилнонадекан	C ₂₀ H ₄₂	56.33	1977	0.064	1.06
Эйкозан	C ₂₀ H ₄₂	56.65	2000	0.085	1.40
2-метилэйкозан	C ₂₁ H ₄₄	56.68	2007	0.252	4.15
2-О-(циклогексилметил) 1-О-гептил оксалат	C ₁₆ H ₂₈ O ₄	56.74	2013	0.041	0.68
2,4-диметилэйкозан	C ₂₂ H ₄₆	57.21	2064	0.083	1.36
2-О-(циклогексилметил) 1-О-октил оксалат	C ₁₇ H ₃₀ O ₄	57.69	2118	0.123	2.02
8-метилэйкозан	C ₂₁ H ₄₄	57.83	2136	0.162	2.66
3-Метилгенейкозан	C ₂₂ H ₄₆	58.03	2162	0.081	1.33
Пентадецилциклогексан	C ₂₁ H ₄₂	58.15	2178	0.299	4.93
(Е)-3-Метилгеникос-2-ен	C ₂₂ H ₄₄	58.26	2192	0.076	1.24
2-Метилгенейкозан	C ₂₂ H ₄₆	58.39	2210	0.174	2.86
Генейкозан-1-ол	C ₂₁ H ₄₄ O	58.84	2277	0.266	4.38
Тетракозан	C ₂₄ H ₅₀	59.76	2400	0.234	3.86
Докозан-1-ол	C ₂₂ H ₄₆ O	59.93	2446	0.152	2.50
(6Е,10Е,14Е,18Е)-2,6,10,14,18-пентаметилэйкоза-2,6,10,14,18-пентаен	C ₂₅ H ₄₂	61.34	2615	0.094	1.55
(6Е,10Е,14Е,18Е)-2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен (сквален)	C ₃₀ H ₅₀	64.2	2831	0.185	3.05
Всего				6.076	100.0

Примечание. RT – время удерживания, мин; RI – индекс удерживания; % – доля соединения среди всех НОС; C – концентрация соединения в экстракте, мг/л.

10 не идентифицированы. В табл. 4 приведены только идентифицированные соединения.

В наибольшей концентрации присутствует (4R)-1-метил-4-проп-1-ен-2-илциклогексен (D-лимонен) (11.23%). D-лимонен – терпеновый углеводород, обладающий антибактериальной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, а также имеющий синергический эффект в сочетании с гентамицином (Costa et al., 2018). Лимонен и гептеналь, являющиеся компонентами экстрактов можжевельника и шалфея, проявляли противомикробную активность относительно бактерий родов *Staphylococcus*, *Escherichia* и дрожжей рода *Candida* (Голованов, 2011). Обнаруженный 2,6,6-триметилбицикло(3,1,1)гепт-2-ен (α-пинен) является терпеном, обладающим активностью против метициллинрезистентного золотистого стафилококка. Также α-пинен проявляет противовоспалительную, антиоксидантную активности и обладает противогрибковым потенциалом (Allenspach, Steuer, 2021). (6Е,10Е,14Е,18Е)-2,6,10,15,19,23-гексаметилтетракоза-2,6,10,14,18,22-гексаен (сквален) – углеводород терпенового ряда, принадлежащий к группе каротиноидов, обладает антиоксидантными свойствами (Pora et al., 2014).

Кластеры генов продукции терпеновых соединений обнаружены в геноме штамма *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 (Lorenzi et al., 2022). Терпеновые соединения широко распространены в природе и имеют важное значение для сохранения экологического баланса в межвидовых взаимоотношениях бактерий, цианобактерий, микроводорослей и их симбионтов, простейших и растений, а также между различными трофическими уровнями (Гольдин, 2011). Эти метаболиты проявляют широкий спектр биологических свойств и участвуют практически во всех функциональных проявлениях действия низкомолекулярных органических веществ в экосистемах (Курашов, 2012; Kurashov et al., 2016).

В экстракте обнаружили достаточное количество алканов, таких как октан (2.34%), декан (0.94%), тетракозан (3.86%), додекан (1.71%), тетрадекан (2.92%) и других. Тетрадекан и додекан являются как природными, так и антропогенными соединениями, которые используют в качестве растворителей и синтетических промежуточных продуктов в промышленности. Считается, что появление алканов в природных экосистемах обусловлено антропогенными факторами. Однако несомненно, что и растения, водоросли и цианобактерии

в природных условиях их синтезируют (Хуан, 2006). Так, присутствие в большой концентрации (23.78%) октакозана связано с массовым развитием цианобактерий *Gloeocapsa* sp. в присутствии диатомовых водорослей рода *Navicula* и зеленых водорослей родов *Chlorella* и *Scenedesmus* (Батаева и соавт., 2014). Высокое содержание алканов выявили в культуральной среде монокультуры цианобактерий *Oscillatoria neglecta* (до 11.14%) (Кирпенко, 2010). В смешанных культурах *Oscillatoria neglecta* и *Anabaena variabilis* количество алканов снижалось. Гептадекан и гексакозан обнаружены в качестве основных алканов в культурах зеленых водорослей *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus acutus*, *S. acuminatus*, *S. obliquus* и цианобактерий вида *Spirulina platensis* (Sivonen, Jones, 1999). Показано, что почвенная цианобактерия *Microcoleus vaginatus* из пустыни Негев, продуцировала 4 нормальных и более 60 разветвленных алканов, состав которых необычен, а также ряд жирных кислот, циклических и ненасыщенных углеводородов, альдегидов, спиртов и кетонов (Дембицкий, 2001). Преобладающими соединениями были гептадекан (12%), 7-метилгептадекан (7.8%), гексадекановая кислота (6.5%) и др. Эфирное масло *Anthemis altissima*, в составе которого находился трикозан, проявляло антимикробную активность по отношению к видам бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Samadi, 2012).

В составе экзогенных метаболитов "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020 в концентрации 0.194 мг/л (3.19%) обнаружена бензойная кислота, которая обладает противомикробными и фунгицидными свойствами (Apostol et al., 2021), поэтому используется в пищевой промышленности как консервант и в медицине как наружный антисептик. Она участвует в аллелопатических взаимодействиях многих наземных и водных растений (Macías, 2008). Значительное количество бензойной кислоты находится в плодах, в том числе в ягодах — клюкве и бруснике (Лютикова, 2013).

Вызывает интерес вещество трибутилфосфат, обнаруженное, хоть и в небольшой концентрации, в составе экзометаболитов "*Anabaena*" sp., но, по всей вероятности, играющее регуляторную роль в функционировании экосистем. Известно, что трибутилфосфат используют при производстве фармакологических препаратов из плазмы крови человека, поскольку он разрушает липидную оболочку вируса, препятствуя сцеплению его с клеткой-мишенью и лишая инфектогенности (Кудашева и соавт., 2015). Наши исследования показали, что это вещество обнаруживается в составе низкомолекулярного метаболита высших водных растений горца земноводного (*Persicaria amphibia* (L.) Delarbre) (Крылова и соавт., 2020) и рдеста

пронзеннолистного (*Potamogeton perfoliatus* L.), причем произрастающих в местах со слабым антропогенным влиянием, в то время как в местах с высокой нагрузкой это вещество в составе метаболитов таких растений не выявлено. Это наталкивает на мысль, что фотосинтезирующие организмы, в том числе и цианобактерии "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020, синтезируют его в качестве экзогенного метаболита, выполняющего функцию разрушения липидных оболочек конкурирующих видов цианобактерий или других бактерий.

Ранее нами был получен патент на изобретение, описывающий способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в аридной зоне с участием культуры IPPAS B-2020 (патент № 2634387). В изобретении подтверждены рост-стимулирующие свойства "*Anabaena*" sp. в отношении ряда сельскохозяйственных культур (кресс-салата, перца болгарского, томата) и фунгицидная активность против фитопатогенных грибов. Аналогичный патент получен исследователями на штамм *Nostoc linckia* IPPAS B-2044, обладающий свойствами стимуляции роста в отношении бобовых, масличных и овощных культур, а также гербицидной активностью (патент № 2734987).

Таким образом, результаты экспериментов показали, что штамм "*Anabaena*" sp. IPPAS B-2020 оказался не фитотоксичным, обладал высокой фунгицидной и антиоксидантной активностями. В составе его вторичных экзогенных метаболитов присутствовали изолимонная, молочная, уксусная кислоты, терпены, алканы, спирты и другие НОС. Обнаруженные соединения, такие как трибутилфосфат, D-лимонен, сквален, α -пинен, известны своей высокой противомикробной активностью.

Штамм IPPAS B-2020 в настоящее время не может быть отнесен ни к одному из валидно описанных родов, и для дальнейшей его идентификации необходимо проводить дополнительные исследования. Изучаемый штамм перспективен не только в качестве оздоравливающего средства с фунгицидной, антиоксидантной, фитостимулирующей активностями в агроэкосистемах, но и как источник метаболитов с ценными свойствами, и может служить основой для разработки полифункциональных биопрепаратов для растениеводства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора. Молекулярно-генетическая идентификация штамма выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700045-3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В настоящей статье отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреюк Е.И., Контева Ж.Л., Занина В.В. Цианобактерии. Киев: Наукова думка, 1990. 159 с.
- Астафьева О.В., Жаркова З.В., Генатулина Г.Н. Исследование фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов соцветий *Tagetespatula* // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2021. Т. 15. № 4. С. 116–120.
- Батаева Ю.В. Особенности микробных комплексов аридной зоны в условиях агро- и техногенеза и их биотехнологическая значимость. Автореферат дис. ... докт. биол. наук, 24.03.2023. Оболенск: ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, 2022. 48 с.
- Батаева Ю.В., Григорян Л.Н., Яковлева Л.В., Магзанова Д.К., Баймухамбетова А.С., Андреева М.Д. Особенности развития томатов при инокуляции цианобактериальными сообществами // АгроЭкоИнфо. 2020. № 2 (40). С. 15.
- Батаева Ю.В., Григорян Л.Н. Оценка фитостимулирующих свойств цианобактерий *Anabaena constricta* IPPAS B-2020 в микроделяночном опыте // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М. Акмулы. 2022. № S2 (63). С. 139–142.
- Батаева Ю.В., Курашов Е.А., Крылова Ю.В. Хромато-масс-спектрометрическое исследование экзогенных метаболитов альго-бактериальных сообществ в накопительной культуре // Вода: Химия и экология. 2014. № 9 (75). С. 59–68.
- Батаева Ю.В., Магзанова Д.К., Григорян Л.Н. Возделывание хлопчатника с применением цианобактерий для биологизации агросистем // Экологические системы и приборы. 2022. № 11. С. 18–25. <https://doi.org/10.25791/esip.11.2022.1331>
- Бессолицына Е.А. Биология цианобактерий. Киров: ФГБОУ ВПО “ВятГУ”, 2012. 51 с.
- Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования. 2001. Т. 27. С. 130–140.
- Домрачева Л.И., Ковина А.Л., Кондакова Л.В., Ашихмина Т.Я. Цианобактериальные симбиозы и возможность их практического использования (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2021. № 3. С. 21–30. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2021-3-021-030>
- Домрачева Л.И., Широких И.Г., Фокина А.И. Антифузариозное действие цианобактерий и актиномицетов в почве и ризосфере // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. С. 157–165.
- Кирпенко Н.И., Курашов Е.А., Крылова Ю.В. Экзогенные метаболитные комплексы двух синезеленых водорослей в моно- и смешанных культурах // Пресноводная гидробиология. 2010. № 2 (43). С. 241–244.
- Крылова Ю.В., Курашов Е.А., Русанов А.Г. Сравнительный анализ компонентного состава низкомолекулярного метаболома горца земноводного (*Persicaria amphibia* (L.) Delarbre) из разнотипных местообитаний в Ладожском озере // Труды Карельского научного центра РАН. 2020. № 4. С. 95–114. <https://doi.org/10.17076/lim1141>
- Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Иванов В.Б., Климов В.И., Корнилова О.Г., Лебединская Е.В., Буянтян Н.Д. Современные технологические подходы к обеспечению вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека // Успехи современного естествознания. 2015. № 5. С. 132–138.
- Курашов Е.А., Крылова Ю.В., Митрукова Г.Г. Компонентный состав летучих низкомолекулярных органических веществ *Ceratophyllum demersum* L. во время плодоношения // Вода: Химия и экология. 2012. № 6. С. 107–116.
- Лютикова М.Н. Изучение состава биологически активных компонентов дикорастущих ягод *Vaccinium vitis-idaea*, *Oxycoccus palustris* в зависимости от степени их зрелости и условий хранения. Автореферат дис. ... канд. хим. наук, 25.06.13. Черноголовка: Институт физиологически активных веществ РАН, 2013. 25 с.
- МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2004. 94 с.
- Панкратова Е.М. Становление функциональных особенностей цианобактерий на путях их сопряженной эволюции с биосферой // Теоретическая и прикладная экология. 2010. № 3. С. 4–11.
- Панкратова Е.М., Трефилова Л.В., Зяблых Р.Ю., Устюжанин И.А. Цианобактерия *Nostoc paludosum* Kütz как основа для создания агрономически полезных микробных ассоциаций на примере бактерий рода *Rhizobium* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 266–272.
- Pankratova E. M., Trefilova L. V., Zyablykh R. Yu., Ustyuzhanin I. A. Cyanobacterium *Nostoc paludosum* Kütz as a basis for creation of agriculturally useful microbial associations by the example of bacteria of the genus *Rhizobium* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 228–234.

- Патент РФ. 2019. № 2734987. Средство для стимуляции роста бобовых, масличных и овощных культур и угнетения сорных растений в агроценозах.
- Патент РФ. 2017. № 2634387. Способ стимуляции роста и развития растений, повышения урожайности и защиты от фитопатогенных грибов в аридной зоне.
- Пиневи́ч А. В., Авери́на С. Г. На краю радуги: длинноволновые хлорофиллы и фотосинтетическая адаптация цианобактерий к дальнему красному свету // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 666–684.
<https://doi.org/10.31857/S0026365622600444>
- Pinevich A. V., Averina S. G. On the edge of the rainbow: red-shifted chlorophylls and far-red light photoadaptation in cyanobacteria // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 631–648.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722602019>
- Темралеева А. Д., Кривина Е. С., Букин Ю. С. Современные подходы к изучению водорослей: ДНК-баркодинг и ДНК-таксономия // Вопросы современной альгологии. 2021. № 2 (26). С. 124–130.
[https://doi.org/10.33624/2311-0147-2021-2\(26\)-124-130](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2021-2(26)-124-130)
- Трефилова Л. В. Использование цианобактерий в агробιοтехнологии. Автореферат дис. ... канд. биол. наук, 24.12.2008. Саратов: Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, 2008. 26 с.
- Трефилова Л. В., Патрушева М. Н. Эффективность использования цианоризобияльного консорциума при выращивании гороха посевного // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 3. С. 67–75.
- Хасанов В. В., Рыжова Г. Л., Мальцева Е. В. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
- Цавкелова Е. А. Структурно-функциональные особенности микробных сообществ эпифитных орхидей: биоразнообразие, роль и биотехнологическая значимость ассоциативных микроорганизмов. Автореферат дис. ... докт. биол. наук, 18.05.2021. М.: Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 2021. 46 с.
- Aguilera A., Berrendero Gómez E., Kaštovský J., Echenique R. O., Salerno G. L. The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria) // Phycologia. 2018. V. 57. P. 130–146.
<https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- Allenspach M., Steuer C. α -Pinene: a never-ending story // Phytochemistry. 2021. V. 190. Art. 12857.
- Apostol T. V., Chifiriuc M. C., Draghici C., Socea L. I., Marutescu L. G., Olaru O. T., Nitulescu G. M., Pahontu E. M., Saramet G., Barbuceanu S. F. Synthesis, *in silico* and *in vitro* evaluation of antimicrobial and toxicity features of new 4-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]benzoic acid derivatives // Molecules. 2021. V. 26. Art. 5107.
<https://doi.org/10.3390/molecules26165107>
- Bataeva Y. V., Dzerzhinskaya I. S., Yakovleva L. V. Composition of phototrophs in different soil types of Astrakhan oblast // Euras. Soil. Sci. 2017. V. 50. P. 943–951.
<https://doi.org/10.1134/s1064229317080026>
- Bataeva Yu. V., Satkalieva M. S., Antonova S. V., Sinetova M. A., Kozlova A. Yu., Astafyeva O. V., Baimuhambetova A. S. Study of antioxidant activity and composition of cyanobacteria metabolites by TLC, HPTLC, and HPLC for the search of environmentally safe cleaning agents // Rus. J. Gen. Chem. 2018. V. 88. P. 2898–2902.
<https://doi.org/10.1134/S107036321813011X>
- Burja A. M., Banaigs B., Abou-Mansour E., Burgess J. G., Wright P. C. Marine cyanobacteria – a prolific source of natural products // Tetrahedron. 2001. V. 57. P. 9347–9377.
- Costa M. D. S., Rocha J. E., Campina F. F., Silva A. R. P., Da Cruz R. P., Pereira R. L. S., Quintans-Junior L. J., Coutinho H. D. M. Comparative analysis of the antibacterial and drug-modulatory effect of D-limonene alone and complexed with β -cyclodextrin // Eur. J. Pharm. Sci. 2019. V. 128. P. 158–161.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.11.036>
- Dabravolski S. A., Isayenkov S. V. Metabolites facilitating adaptation of desert cyanobacteria to extremely arid environments // Plants. 2022. V. 11. Art. 3225.
<https://doi.org/10.3390/plants11233225>
- Duval C., Thomazeau S., Drelin Y., Yepremian C., Bouvy M., Couloux A., Troussellier M., Rousseau F., Bernard C. Phylogeny and salt-tolerance of freshwater *Nostocales* strains: contribution to their systematics and evolution // Harmful Algae. 2018. V. 73. P. 58–71.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.01.008>
- Eden P. A., Schmidt T. M., Blakemore R. P., Pace N. R. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1991. V. 41. P. 324–325.
<https://doi.org/10.1099/00207713-41-2-324>
- Fadl-Allah E. M., El-komy H. M., Al-Harbi N. A., Sholkamy E. N. *In vitro* creation of artificial nitrogen fixing cyanobacterium (*Nostoc muscorum*) association with wheat // African J. Microbiol. Res. 2011. V. 5. P. 302–310.
- Ferrari P. F., Palmieri D., Casazza A. A., Aliakbarian B., Perego P., Palombo D. TNF α -induced endothelial activation is counteracted by polyphenol extract from UV-stressed cyanobacterium *Arthrospira platensis* // Med. Chem. Res. 2015. V. 24. P. 275–282.
- Goldwhite H. Short summary of the career of the German organic chemist, Hermann Kolbe // New Haven Section Bull. Am. Chem. Soc. J. 2003. V. 20. P. 203–218.
- Hirsch A. M. Hormonal regulation in plant-microbe symbioses (symposium remarks) // Biology of Plant-Microbe Interactions. 2004. V. 4. P. 389–390.
- Iteman I., Rippka R., Marsac N. T., Herdman M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA–23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria // Microbiology (Reading). 2000. V. 146. P. 1275–1286.
<https://doi.org/10.1099/00221287-146-6-1275>

- Gerwick W.H., Coates R.C., Engene N., Gerwick L., Grindberg R.V., Jones A.C., Sorrels C.M. Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals // *Microbe*. 2008. V. 3. P. 277–284.
- Kajiya S., Kanzaki H., Kawazu K., Kobayashi A. Nostofungicide, an antifungal lipopeptide from the fieldgrown terrestrial bluegreen alga *Nostoc commune* // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 3737–3740.
- Kaštovský J., Gomez E.B., Hladil J., Johansen J.R. *Cyanocohniella calida* gen. et sp. nov. (Cyanobacteria: Aphanizomenonaceae) a new cyanobacterium from the thermal springs from Karlovy Vary, Czech Republic // *Phytotaxa*. 2014. V. 181. P. 279–292. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.181.5.3>
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach // *Preslia*. 2014. V. 86. P. 295–335.
- Komárek J. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota 3. Teil/3rd part: Heterocytous Genera // Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2013. 1131 p.
- Kozlíková-Zapomělová E., Chatchawan T., Kaštovský J., Komárek J. Phylogenetic and taxonomic position of the genus *Wolleea* with the description of *Wolleea salina* sp. nov. (Cyanobacteria, Nostocales) // *Fottea*. 2016. V. 16. P. 43–55. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.026>
- Kurashov E.A., Krylova J.V., Mitrakova G.G., Aleshina D.G., Bataeva Y.V., Astafyeva O.V. Low-molecular weight metabolites in *Spirodela polyrhiza* (L.) Scheiden from Northwest Russia in the middle of the growing season // *Ponte*. 2016. V. 72. P. 10–22. <https://doi.org/10.21506/j.ponte.2016.10.2>
- Kumar J., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. UVB induces biomass production and nonenzymatic antioxidant compounds in three cyanobacteria // *J. Appl. Phycol.* 2016. V. 28. P. 131–140.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Lacap-Bugler D.C., Lee K.K., Archer S., Gillman L.N., Lau M.C.Y., Leuzinger S., Lee C.K., Maki T., McKay C.P., Perrott J.K., de los Rios-Murillo A., Warren-Rhodes K.A., Hopkins D.W., Pointing S.B. Global diversity of desert hypolithic cyanobacteria // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 867. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00867>
- Lamb G.D., Stephenson D.G. Point: Counterpoint: Lactic acid accumulation is an advantage disadvantage during muscle activity // *J. Appl. Physiology*. 2006. V. 100. C. 1410–1412.
- Lorenzi A.S., Bonatelli M.L., Varani A.M., Quecine M.C., Bittencourt-Oliveira M.D.C. Draft genome sequence of the cyanobacterium *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* BCCUSP55 from the Brazilian semiarid region reveals potential for anti-cancer applications // *Arch. Microbiol.* 2022. V. 204. P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02602-1>
- Macias F.A., Galindo J.L.G., Garcia-Diaz M.D., Galindo J.C.G. Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models // *Phytochem. Rev.* 2008. V. 7. P. 155–178.
- Mironov K.S., Los D.A. RNA Isolation from *Synechocystis* // *Bio-protocol*. 2015. V. 5. Art. e1428. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1428>
- Molyneux P., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity // *J. Sci. Technol.* 2004. V. 26. P. 211–219.
- Nübel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 3327–3332.
- Popa I., Băbeanu N., Niță S., Popa O. Squalene – natural resources and applications // *Farmacia*. 2014. V. 62. P. 840–862.
- Prasanna R., Jaiswal P., Shrikrishna J., Joshi M., Nain L., Rana A., Shivay Y.S. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat // *J. Agricult. Technol.* 2012. V. 8. P. 157–171.
- Ramamurthy V.D., Raveendran S., Thirumeni S., Krishnaveni S. Antimicrobial activity of heterocytic Cyanobacteria // *Int. J. Adv. Life Sci.* 2012. V. 1. P. 32–39.
- Samadi N., Manayi A., Vazirian M., Samadi M., Zeinalzadeh Z., Saghari Z., Abadian N., Mozaffarian V.O., Khanavi M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Anthemis altissima* L. var. *altissima* // *Nat. Prod. Res.* 2012. V. 26. V. 20. P. 1931–1934.
- Singh R., Parihar P., Singh M., Bajguz A., Kumar J., Singh S., Singh V.P., Prasad S.M. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: current status and future prospects // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 515. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00515>
- Sivonen K., Jones G. Cyanobacterial toxins // *Toxic cyanobacteria in water – a guide to their public health consequences, monitoring and management* / Eds. Chorus I., Bartram J. London: E. and F.N. Spon, 1999. P. 41–111.
- Strunecký O., Ivanova A.P., Mareš J. An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis // *J. Phycol.* 2023. V. 59. P. 12–51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Takeuchi M., Kawai F., Shimada Y., Yokota A. Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria: emended description of the genus *Sphingomonas* and new descriptions of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov. and *Sphingomonas terrae* sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 1993. V. 16. P. 227–238. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80473-x](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80473-x)
- Tawong W., Pongcharoen P., Pongpadung P., Ponza S. *Neowolleea manoromense* gen. & sp. nov. (Nostocales,

- Cyanobacteria*), a novel geosmin producer isolated from Thailand // *Phytotaxa*. 2019. V. 424. P. 1–17. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.424.1.1>
- Verma S., Thapa S., Siddiqui N., Chakdar H. Cyanobacterial secondary metabolites towards improved commercial significance through multiomics approaches // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 38. Art. 100. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03285-6>
- Wang H., Halary S., Duval C., Bernard C., Troussellier M., Beniddir M.A., Brunel J.-M., Castaldi A., Caudal F., Golléty C., Martin C., Bourguet-Kondracki M.-L., Duperron S. Diversity, metabolome profiling and bioactivities of benthic filamentous cyanobacteria isolated from coastal mangroves of Mayotte // *Front. Mar. Sci.* 2023. V. 10. Art. 1201594. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1201594>
- Willey J.M., Gaskell A.A. Morphogenetic signaling molecules of the streptomycetes // *Chem. Rev.* 2011. V. 111. P. 174 – 187.
- Xuan T.D., Chung M., Khanh T.D., Tawata S. Identification of phytotoxic substances from early growth of barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*) root exudates // *J. Chem. Ecol.* 2006. V. 32. P. 895–906.

 EXPERIMENTAL ARTICLES

Characterization of Biological Activity and Evaluation of Exogenous Metabolites of Cyanobacteria “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020

Yu. V. Bataeva^{1, *}, M. A. Sinetova², E. A. Kurashov³, J. V. Krylova³, L. V. Kolombet¹, and L. N. Grigoryan⁴

¹State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, 142279, Russia

²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276, Russia

³Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742, Russia

⁴Astrakhan State University named after V.N. Tatishchev, 414056, Astrakhan, Russia

*e-mail: aveatab@mail.ru

Abstract. Culture of cyanobacteria “*Anabaena*” sp. isolated from alluvial meadow soils in the south of Russia and deposited in the collection of cultures of microalgae and cyanobacteria IPPAS of the Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev RAS under the number IPPAS B-2020. Phylogenetic analysis showed that the studied strain belongs to a clade that unites the genera *Sphaerospermopsis*, *Amphiheterocytum*, *Raphidiopsis*, *Wolleea* and *Neowolleea*, but cannot currently be assigned to any of them. The phytotoxicity, fungicidal and antioxidant activities of the strain were studied. The culture turned out to be non-toxic. Water-alcohol extract and biomass of “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 had a complete suppression of micromycetes *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sporotrichioides* with a maximum diameter of the growth inhibition zone of 2.5 cm. The water extract of cyanobacteria “*Anabaena*” sp. had pronounced antioxidant activity. IPPAS B-2020 in the amount of 20 µl – 39.3%. As part of the metabolites of “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 detected organic acids (citric, lactic, acetic), terpenes, alkanes, alcohols and other low molecular weight organic compounds. Culture “*Anabaena*” sp. IPPAS B-2020 is of interest for biotechnology as a producer of such important biologically active compounds as tributyl phosphate, D-limonene, squalene, α-pinene.

Keywords: cyanobacteria, Aphanizomenonaceae, metabolites, antioxidant activity, fungicidal activity, extract, gas chromatography-mass spectrometry