

DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-162-184

УДК 581.5:633. 358:577.13

**ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯЦИИ  
*RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* И *AZOTOBACTER  
CHROOCCUS* НА СОДЕРЖАНИЕ НЕГАТИВНЫХ  
АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ  
В КОРНЕВЫХ ЭКССУДАТАХ ПРОРОСТКОВ  
ГОРОХА (*PISUM SATIVUM L.*)**

*Л.Е. Макарова, И.С. Капустина, А.С. Мориц, С.С. Макаров*

*Механизмы взаимодействия бобовых культур с азотфиксирующими бактериями разных типов взаимоотношения с ними (эндо- и эктосимбионты) не изучены, однако исследования их актуальны. Данные литературы удостоверяют о проявлениях защитных реакций на начальных этапах взаимодействия бобового растения с бактериями в клетках самого растения и в его ризосфере. На уровне ризосферы показателями этих реакций могут быть изменения содержания в корневых экссудатах компонентов антимикробного действия.*

*Цель работы – изучение защитной (антимикробной) реакции проростков гороха (*Pisum sativum L.*) сорта Торсдаг на инокуляцию бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (эндосимбионт) и *Azotobacter chroococcum* (эктосимбионт), вносимых в водную среду роста корней. О реакции судили по изменениям содержания в корневых экссудатах негативных аллелопатических соединений: пизатина, *N*-фенил-2-нафтиламина (*N*-ФНА), фталатов. После инокуляции проростки росли в условиях гидрокультуры 1 сут в камере “BINDER KBW-240” при 21°C, освещении 81 μМ.м<sup>2</sup>сек<sup>-1</sup> и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь). В этилацетатных экстрактах из среды роста корней методом ВЭЖХ определяли содержание перечисленных соединений, а методом ГХ-МС – состав и соотношение фталатов. Обнаружены различия по влиянию ризобий и азотобактера на содержание этих соединений и на соотношения видов фталатов, неодинаковая активность штаммов бактерий в деградировании *N*-ФНА до фталатов от его концентрации в среде, разное влияние *N*-ФНА на жизнеспособность использованных в экспериментах бактерий.*

*Заключение. Изменения в составе исследуемых соединений в среде роста корней у проростков гороха указывают на снижение защитной (антимикроб-*

ной) реакции в их ризосфере при инокуляции бактериями *A. chroococcum*, а при инокуляции бактериями *R. leguminosarum* – на ее усиление.

**Ключевые слова:** *Pisum sativum* L.; *Rhizobium*; *Azotobacter*; корневые экссудаты; пизатин; *N*-фенил-2-нафтиламин (*N*-ФНА); фталаты

**Для цитирования.** Макарова Л.Е., Капустина И.С., Мориц А.С., Макаров С.С. Влияние инокуляции *Rhizobium leguminosarum* и *Azotobacter chroococcum* на содержание негативных аллелопатических соединений в корневых экссудатах проростков гороха (*Pisum sativum* L.) // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2021. Т. 13, № 2. С. 162-184. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-162-184

## EFFECT OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* AND *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* INOCULATION ON THE CONTENT OF NEGATIVE ALLELOPATHIC COMPOUNDS IN ROOT EXUDATES OF PEA SEEDLINGS (*PISUM SATIVUM* L.)

*L.E. Makarova, I.S. Kapustina, A.S. Morits, S.S. Makarov*

*Research on the mechanisms of plant-microbial interactions is currently relevant. Many researchers have shown that when a legume plant starts to interact with bacteria, protective reactions develop in the cells of the plant and in its rhizosphere. Changes in the content of the antimicrobial reaction components of root exudates can be the protective reaction indicators at the rhizosphere level.*

**The aim of this research** was to study the protective (antimicrobial) reaction of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings of the Torsdag variety to the inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (endosymbiont) and *Azotobacter chroococcum* (ectosymbiont) introduced into the aqueous medium of the root growth. The reaction indicators were changes in the content of negative allelopathic compounds in root exudates: pisin, *N*-phenyl-2-naphthylamine (*N*-PNA), and phthalates. After the inoculation, the seedlings grew for 24 h in the BINDER KBW-240 chamber at 21°C, with lighting of 81  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$  and a 16/8 h day/night photoperiod. In ethyl acetate extracts from the aqueous medium where the seedling roots were immersed, the content of the compounds was determined by HPLC, while changes in the composition and ratio of phthalates were determined by GC-MS. The different effects of rhizobia and azotobacter on the content of the above compounds and on the ratio of phthalate types in root exudates were established. Data indicating the different ability of both bacterial

*species to degrade N-PNA to phthalates and the dependence of this process activity in the bacteria studied on its concentration in the medium were presented. N-PNA differently but negatively affected the viability of the bacteria used in the experiments.*

**Conclusion.** *The changes in the content of the studied compounds in the root growth medium allow us that there was a decrease in the antimicrobial reaction in pea seedling rhizosfera when inoculated with *A. chroococcum*. However, this reaction intensified when inoculated with bacteria of the genus *Rhizobium*.*

**Keywords:** *Pisum sativum L.; Rhizobium; Azotobacter; root exudates; pisatin; N-phenyl-2-naphthylamine; phthalates*

**For citation.** *Makarova L.E., Kapustina I.S., Morits A.S., Makarov S.S. Effect of Rhizobium Leguminosarum and Azotobacter Chroococcum Inoculation on the Content of Negative Allelopathic Compounds in Root Exudates of Pea Seedlings (Pisum Sativum L.). Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture, 2021, vol. 13, no. 2, pp. 162-184. DOI: 10.12731/2658-6649-2021-13-2-162-184*

Известно, что в обеспечении растений азотом особая роль принадлежит почвенным микроорганизмам, среди которых внутриклеточные, эндофитные и эпифитные азотфиксаторы [9]. Более высокой эффективностью азотфиксации характеризуются бактерии, поселяющиеся в корневых и стеблевых клубеньках, формирующихся у растений. Полагают, что в качестве возможных поставщиков доступных для бобового растения азотных соединений, необходимых на первых этапах формирования клубеньковых азотфиксирующих структур, служат ризосферные свободноживущие азотфиксирующие бактерии из родов *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus* [7].

Из результатов работ [1, 2] следовало, что совместное действие на бобовое растение бактерий из родов *Rhizobium* и *Azotobacter*, оказывается полезным для его роста. При этом показано, что ассоциативные бактерии *Azotobacter chroococcum*, как и ризобии, в начальные периоды после инокуляции могут вызывать защитные реакции в клетках их корней, даже более заметные, чем клубеньковые бактерии.

Защитные реакции растений в ответ на инфицирование проявляются не только на уровне клеток их органов, но и на уровне их ризосферы. В прикорневой зоне протекторную функцию принимают на себя экскретуемые корневыми клетками во внешнюю среду компоненты, обладающие антимикробным действием. В числе веществ такого рода действия различные по структуре соединения. В первую очередь – фитоалексины, которые отличаются по химической структуре не только у разных родов растений, но и у видов одного рода [23]. Фитоалексины усиленно синте-

зируются растениями не только при действии на них фитопатогенов, но и бактерий, вступающих с растением в мутуалистические взаимоотношения, и при биотических стрессах [26, 29]. При высоких концентрациях антимикробным действием могут обладать ряд синтезируемых растениями низкомолекулярных соединений, названных “фитоантисипинами” (phytoanticipins) [30]. К фитоантисипинам отнесены присутствующие в клетках растений в нормальных для них условиях существования ароматические соединения. Они повышено накапливаются в тканях растения в условиях стрессов и секретируются растением в экссудаты. У растений гороха к таковым можно отнести циннамилфенолы, 2'-метоксисалкон и изофлавоноиды, которые обнаружили в их тканях в условиях стресса [12]. Вместе с тем, в клетках гороха и других видов бобовых растений, наряду с фитоалексином пизатином у бобовых культур в корнях и в корневых экссудатах в весьма заметных количествах обнаружены алкалоид необычной структуры – N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты [22]. Данные соединения вполне могут принимать участие в негативном контроле роста бактерий, вступающих в эндосимбиоз с бобовыми культурами, а также роста других почвенных бактерий [21, 22]. В настоящее время N-ФНА и фталаты отнесены к опасным для живых организмов веществам [11, 16, 24], а негативная роль пизатина показана также и в отношении некоторых видов растений [17].

В результате проведенной нами серии экспериментов [5, 19, 20, 22] в корневых экссудатах проростков гороха прослежена зависимость содержания пизатина, N-ФНА и дибутилфталата от размера корня и от вида воздействующих на корни бактерий. Показано влияние условий освещения и температуры на количество N-ФНА и фталатов, а также условий температуры на состав фталатов. При этом мы стремимся выяснить роль этих соединений во взаимодействии бобовых культур с различными почвенными микроорганизмами. Наиболее вероятная роль N-ФНА и фталатов в качестве негативных регуляторов роста бактерий нами показана в основном на примере бактерий, вступающих в симбиотические отношения с растениями гороха [21, 22]. Во взаимоотношениях бобового растения со свободно живущими азотфиксирующими бактериями, не проникающими в его ткани, участие данных соединений не было изучено. Мы полагаем, что N-ФНА и фталаты совместно с пизатином являются потенциальными кандидатами и для контроля роста ассоциативных бактерий, которые могут накапливаться в естественных условиях в прикорневой зоне растения гороха.

Ризосферные бактерии способны подвергать катаболизму многие ароматические соединения. Поэтому наряду с секретируемыми растением во внешнюю среду ароматическими соединениями в их ризосфере вполне могут оказаться продукты их биodeградации при участии присутствующих здесь же бактерий. Некоторые из образовавшихся продуктов деградации могут оказаться факторами модуляции метаболических процессов в клетках бактерий. Нами установлено, что некоторые виды почвенных бактерий способны деградировать N-ФНА до фталатов [21]. Это дало основание полагать, что таким образом бактерии могут способствовать изменениям в прикорневой зоне растения концентрации N-ФНА и количественного соотношения в составе фталатов.

Цель настоящей работы – сравнение защитной (антимикробной) реакции проростков гороха, проявляющейся на уровне ризосферы в начальные периоды инфицирования их корней бактериями *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *A. chroococcum*, различных по специфике отношений с растениями гороха (эндосимбионт и эктосимбионт). Для этого через 1 сут после инокуляции бактериями в корневых экссудатах проростков гороха сравнивали изменения содержания пизагина, N-ФНА и фталатов, влияние N-ФНА на жизнеспособность обоих штаммов бактерий и деградирующие способности этих бактерий в отношении N-ФНА.

### Материалы и методы

Объектами исследований служили проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг и бактерии *R. leguminosarum* bv. *viceae* (штамм RCAM1022, получен из Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии, г. Пушкин) и *A. chroococcum* (штамм Az d10 ВКМ В-2272 Д), из коллекции Центра коллективного пользования (ЦКП) “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений (СИФИБР) СО РАН, г. Иркутск).

Семена гороха, используемые для получения проростков, обеззараживали путем промывания водой с мылом и с последующей обработкой 3%-ным раствором перекиси водорода. Эксперименты с проростками проводили по схеме, описанной нами ранее [5]. Согласно схеме прорастание семян и рост проростков, служивших исходным материалом в работе, проводили на влажной фильтровальной бумаге, в термостате без освещения при температуре 21°C в течение 48 ч. Далее проростки инкубировали в условиях гидрокультуры в камере BINDER KBW-240 (“Binder”, Германия) при 21°C, освещении 81  $\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$  и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в те-

чение 24 ч. Объем раствора в сосудах составлял 250 мл, число проростков, приходившихся на 1 сосуд – 36. Размеры корней исходных проростков составляли в длину 35 – 38 мм, по окончании эксперимента – 45 – 50 мм. В водную среду для проростков вносили необходимые для их роста микроэлементы из расчета 1 мл/л воды каждого раствора солей:  $ZnSO_4$  (0.05 г/л),  $NaMoO_4$  (1.76 г/л),  $CuSO_4$  (0.05 г/л),  $MnCl_2$  (0.35 г/л),  $H_3BO_3$  (0.5 г/л). Одновременно с помещением корней проростков в водную среду в нее вносили бактерии (*R. leguminosarum* bv. *viceae*, *A. chroococcum*), но не вносили их в среду с растениями контроля. Инокуляцию осуществляли в период помещения корней проростков в водную среду. Инокулят бактерий вносили в сосуды в виде водного смыва с твердой агаризованной среды до концентрации  $4.0 \times 10^5$  кл./мл.

**Культуры бактерий.** Твердые агаризованные среды для клубеньковых бактерий готовили на гороховом отваре согласно прописи из работы [3], для азотобактера применяли среду Эшби. Для получения показателей жизнеспособности бактерий и для исследований продуктов деградации N-ФНА использовали планктонные культуры бактерий. Их выращивали в жидкой минимальной среде, приготовленной, как описано в работе [15], но с использованием 0.1% глюкозы в качестве углеводного источника питания для бактерий. После предварительной 1-сут адаптации в указанной среде бактерии переносили в такую же среду с N-ФНА (“Sigma”, США) для инкубации течение 1-2 сут в колбах на роторной качалке, без освещения и при температуре 20-22°C.

Титр бактерий в смывах с твердых сред, вносимых в колбы и в сосуды с корнями проростков, а также в жидких культуральных средах с бактериями, измеряли на планшетном спектрофотометре “Immunochem-2100” при 675 нм (“High Technology Inc.”, США).

**Изучение деградации N-ФНА бактериями и его влияния на жизнеспособность бактерий.** В конические стеклянные колбы объемом 0,5 л вносили жидкую минимальную среду, N-ФНА (до концентрации 10 или 100 мкМ), и небольшой объем суспензии из колбы с адаптированными бактериями. Общий объем жидкости в колбах составлял 0.25 л. Колбы с бактериями помещали на роторную качалку (60 об./мин) и инкубировали 1 или 2 сут при температуре 20 – 22°C.

При изучении деградации N-ФНА в колбы вносили бактериальные суспензии до достижения в инкубационной среде концентрации бактерий  $1.5 \times 10^3$  кл./мл. Выросшую культуру центрифугировали при 8000 g в течение 20 мин при 4°C, используя центрифугу модели “Avanti J-26 XP JLA”

(“Beckman Coulter”, США). Из супернатанта, после подкисления 2 н HCl до pH 3.0–4.0, этилацетатом экстрагировали ароматические соединения. Полученные экстракты упаривали досуха в вакууме в темноте, сухой остаток растворяли в небольших объемах очищенного от перекисей этилацетата и помещали в стеклянные бутылочки для газово - хромато-масс-спектрометрического (ГХ-МС) анализа.

При изучении влияния N-ФНА на жизнеспособность бактерий их титр в начале экспозиции составлял  $4.5 \times 10^3$  кл./мл. Процент жизнеспособных клеток в составе аутоагрегатов бактерий, присутствовавших в культуральных средах, определяли по флуоресценции после обработки последовательно, 0.5%-ным пропидий йодидом (маркер для мертвых клеток), затем 50 мМ флуоресцеин диацетатом (маркер для живых клеток). Для просмотра бактерий-содержащих суспензий использовали инвертированный микроскоп “Axio Observer” (“Carl Zeiss Microscopy”, Германия). Определяли процент живых клеток от общего количества клеток в составе плавающих в культуральной жидкости аутоагрегатов (скопление бактерий, погруженных в слизистую матрицу) на 10-ти случайно взятых полях.

***Получение экстрактов аллелопатических веществ, входящих в состав корневых экссудатов.*** Фенольные соединения корневых экссудатов извлекали из водной среды для роста корней после подкисления раствором 2 н. HCl до pH 3.0. Трехкратную экстракцию осуществляли при помощи этилацетата (соотношение 1:1, v/v), который затем упаривали в токе холодного воздуха в условиях затемнения. Сухой остаток растворяли 1.0 мл метанола и содержащиеся в нем соединения исследовали методом ВЭЖХ. Затем из экстракта в вакууме удаляли метанол. Остаток перерастворяли в этилацетат, производили силилирование соединений экстракта (БСА + ГМДС) и исследовали их состав методом ГХ-МС-анализа. Экстракты в обоих растворителях помещали в стеклянные вials.

***Определение содержания аллелопатических соединений методом ВЭЖХ.*** Определение содержания пизатина, N-ФНА и дибутилфталата осуществляли методом ВЭЖХ на хроматографе “Shimadzu LC-10ATvp” с УФ-детектором (“Shimadzu”, Япония). Схема разделения, способы идентификации соединений подробно описаны в работе [21]. Для идентификации и получения калибровочных графиков использовали аутентичные образцы N-ФНА (“Sigma”, США), дибутилфталата (“Реахим”, Россия) и пизатина, который был ранее любезно предоставлен профессором Х.Д.



Ван-Эттенем (Отдел науки о растениях университета Аризоны, США). Детектирование соединений проводили при 280 нм. Количественные расчеты производились по адсорбционным профилям по высоте пиков, с использованием калибровочных графиков, построенных для разных концентраций исследуемых соединений. Величины достоверности аппроксимации ( $R^2$ ) составляли 0.96 – для N-ФНА, 0.98 – для дибутилфталата, 0.99 – для пизатина.

**Исследование состава фталатов в корневых экссудатах и в культуральных средах методом ГХ-МС-анализа.** Анализ состава фталатов в экстрактах проводили с использованием хромато-масс-спектрометра “7000QQTripleQuad/7890A MSD/DS” (“Agilent Technology”, США). Схема проведения ГХ-МС-анализа подробно изложена в работе [11]. Анализ проводили в режиме регистрации полного ионного тока (SCAN). Для идентификации анализируемых соединений использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7, а также проводили сравнение с аутентичными образцами N-ФНА (“Sigma”, США), дибутилфталата (“Реахим”, Россия), бис(2-этилгексил)фталата (синоним – диоктилфталат) и диэтилфталата (“Sigma –Aldrich”, Германия). Бутил-тетрадецил фталат идентифицирован по данным библиотеки масс-спектров NIST08.

### **Статистическая обработка результатов**

Для статистической обработки полученных результатов использовали Microsoft Excell. На рисунках и в таблицах приведены средние значения и стандартные отклонения для них, которые получены из трех независимых экспериментов.

### **Результаты и их обсуждение**

При сравнении данных, полученных методом ВЭЖХ для растений контрольного варианта и инокулированных *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *A. chroococcum*, видится различный характер влияния двух видов бактерий на содержание в среде роста корней пизатина, N-ФНА и дибутилфталата (рис. 1). Инокуляция ризобиями приводила к увеличению общего содержания перечисленных соединений, в основном за счет пизатина, а при инокуляции азотобактерами – к уменьшению. При этом содержание N-ФНА падало более, чем в 10 раз, пизатина и дибутилфталата – в 1,2 и 1,4 раза, соответственно. В итоге, в расчете на 1 проросток общее количество названных соединений в водной среде роста корней в присутствии ризобий оказалось выше в 2,3 раза, чем в присутствии азотобактера.



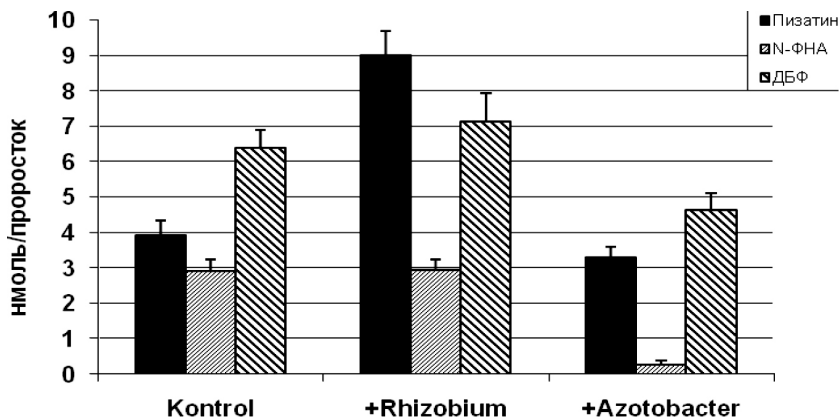


Рис. 1. Водная среда для корней

Методами ГХ-МС-анализа в среде роста корней проростков гороха идентифицировали фталаты четырех видов: дибутил-, диоктилфталат, диэтилфталат и бутил-тетрадецилфталат (рис. 2). Среди них по процентному отношению площадей пиков у растений контроля и инокулированных ризобиями практически в равной мере доминировали дибутил фталат и диоктил фталат. В среде с азотобактером среди фталатов преобладал диоктилфталат. Площадь пика для него почти в 2 раза превышала таковые для дибутил фталата и диэтилфталата. У растений всех вариантов выращивания среди фталатов 3-6% составлял бутил-тетрадецил фталат, промежуточное соединение при образовании дифталатов с одинаковыми углеводородными цепочками.

Выше отмечено, что инокуляция ризобиями способствовала увеличению в среде роста корней общего содержания изучаемых соединений, в основном за счет пизатина. Синтез данного фитоалексина свойственен растениям гороха. Среди исследуемых нами соединений пизатин в наибольшей степени изучен по его антигрибным и антибактериальным свойствам, которые имеют значение в межорганизменных взаимоотношениях. У растений гороха усиление аккумуляции пизатина наблюдали под влиянием грибных и бактериальных инфекций, в условиях абиотических стрессов [29, 30]. Пизатин может подавлять бактерии из рода *Rhizobium*, нодулирующие корни бобовых культур [13, 26]. При этом у разных штаммов *R. leguminosarum* замечена неодинаковая чувствительность к пизатину. У некоторых представителей грибных патогенов бобовых культур

из рода *Fusarium* снижение чувствительности к пизатину объясняли обнаруженной у них способностью деградировать данное соединение [30]. Подобные явления деградации пизатина не зафиксировали в научной литературе у бактерий, тем не менее, у этих микроорганизмов они вполне допускаются [13]. В наших исследованиях на деградацию пизатина бактериями *A. chroococcum* косвенно показывает понижение его уровня в среде роста корней проростков гороха, по сравнению с растениями контроля (рис. 1).

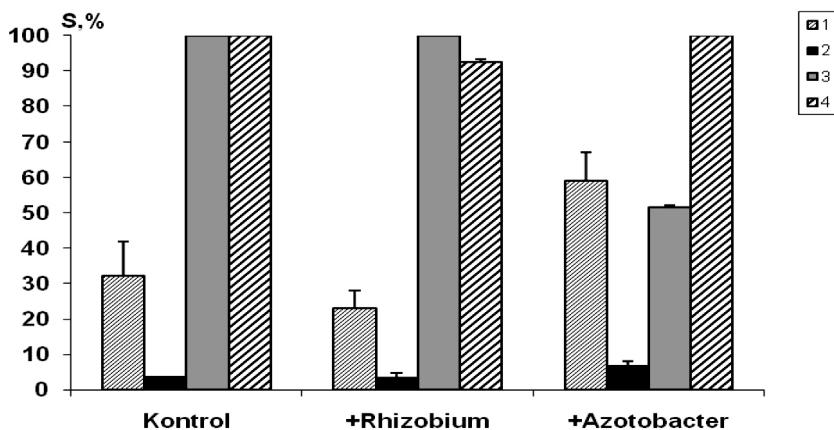


Рис. 2. Влияние бактерий *R. leguminosarum* *bv. viceae* и *A. chroococcum* на соотношение фталатов в среде роста корней проростков гороха через 1 сут экспозиции.

1 – диэтилфталат; 2 – бутил-тетрадецил фталат; 3 – дибутилфталат; 4 – диоктилфталат. По оси абсцисс: вариант водной среды для роста корней; по оси ординат: S, % – относительный показатель площади для пиков на хроматограмме (ГХ-МС) для фталатов, в %

Обнаруженную в среде роста корней проростков разницу по содержанию N-ФНА при инокуляции ризобиями и азотобактерами мы объясняем неодинаковой активностью деградации данного соединения этими видами бактерий. Мы полагаем, что уменьшение содержания N-ФНА в среде роста корней проростков при инокуляции бактериями *Azotobacter* произошло вследствие его активной деструкции в клетках данного вида бактерий. Данная способность катаболизировать N-ФНА с образованием фталатов нами показана у *R. leguminosarum* *bv. viceae*, *Pseudomonas syringae* *pv. pisi*, *Clavibacter michiganensis* *sps. sepedonicus* [21]. У *A. chroococcum* на способность осуществлять те же процессы показывает появление фталатов в культуральных средах с N-ФНА (табл. 1).

Активность деградации N-ФНА азотобактером и ризобиями можно оценить по соотношениям площадей пиков для данного субстрата и для продуктов, образовывавшихся при его деградации – фталатов (табл. 1). Сравнение площадей пиков показывает, что за 1 сут экспозиции бактериями *Azotobacter* 10 мкМ N-ФНА в культуральных средах деградировано полностью, а ризобиями – лишь частично. Такая разница по деградирующей способности в отношении N-ФНА у азотобактеров и ризобий может быть объяснением возникшей под их влиянием разницы по содержанию его в средах роста корней (рис. 1).

Таблица 1.

Состав соединений в этилацетатных экстрактах из ростовых сред бактерий, росших 1-сут с 10 мкМ или 2-сут с 100 мкМ N-ФНА

Соединение	t <sub>уд.</sub> , мин	Ver., %	S, %			
			10 мкМ		100 мкМ	
			<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viceae</i>	<i>A. chroococcum</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>bv. viceae</i>	<i>A. chroococcum</i>
Фталевый ангидрид	8,0	50,5	0,3±0,1	-	0,4±0,1	-
о-Фталевая кислота			-	-		
Диэтилфталат	14,1	35,0	-	8,42±0,55	1,3±0,3	2,6±0,2
Бутил-октил фталат	19,9	11,8	-	3,25±0,13		
Дибутилфталат	21,6	29,3	3,21±0,26	100	4,3±0,6	0,7±0,1
N-ФНА	26,6	47,5	30,23±1,62	0	100	100
Диоктилфталат	31,7	71,5	100	57,7±3,7	0,6±0,1	-
(бис-7-метил-октил) фталат	34,9	65,9	1,16±0,20	-	-	-

**Примечание к таблице 1.** Обозначения: t<sub>уд.</sub> – время удерживания, Ver, % – вероятность, S, % – относительная площадь пика. В таблице приведены средние показатели для относительной площади пика (S, %) и стандартные отклонения для них.

Снижение активности деградации N-ФНА у исследуемых бактерий происходило при его концентрации в среде 100 мкМ (табл. 1). Его можно заметить при сопоставлении соотношений пиков для фталатов и N-ФНА в культуральных средах с 10 и 100 мкМ N-ФНА, учитывая при этом длительность культивирования.

Различия по активности катаболизма ароматических соединений у сравниваемых видов бактерий, скорее всего, предопределены на генетическом уровне. Для бактерий рода *Rhizobium* индуцибельный синтез ферментов, участвующих в катаболизме ароматических соединений, является

характерной особенностью [27]. Более высокая, чем у ризобий, активность при деградации N-ФНА (10 мкМ) у используемого в наших экспериментах штамма бактерий *A. chroococcum*, позволяет полагать, что синтез ферментов, необходимых для биodeградации названного соединения, у этих бактерий экспрессируется конститутивно. Протокатехоат оксигеназа, которая может участвовать при деградации полициклических ароматических соединений по фталатному пути до образования кислот цикла Кребса [18], была очищена из *A. vinelandii*, другого представителя рода *Azotobacter*, и изучена после выращивания этих бактерий на среде с п-гидроксibenзоатом [14]. Возможно, именно стабильное присутствие данного фермента в клетках штамма *A. chroococcum* позволяет объяснить его устойчивость к дельтометрину, одному из свойств, которое было в числе определяющих при его селектировании [4]. Косвенным подтверждением тому, что фталатный путь при деградации N-ФНА азотобактерами завершается расщеплением протокатеховой кислоты до  $\beta$ -карбоксии-цис-цис-муконаата при участии фермента протокатехоат оксигеназы (EC 1.13.11.3) [18] могут быть данные на рисунке 1 и в таблице 1. Это наиболее низкий показатель содержания N-ФНА и фталатов (рис. 1) в среде роста корней с азотобактером и высокая катаболическая активность этих бактерий в отношении 10 мкМ N-ФНА (табл. 1), о которых уже было сказано выше.

Представленные в таблице 2 данные, характеризуют изменения жизнеспособности бактерий *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *A. chroococcum* и являются свидетельством негативного влияния N-ФНА на эти виды бактерий.

Таблица 2.

**Процент жизнеспособных клеток в составе аутоагрегатов бактерий, росших в планктонных культурах без внесения (контроль) и с внесением в среду 10 и 100 мкМ N-ФНА**

Вариант	Длительность экспозиции, сут	Вид бактерий	
		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>A. chroococcum</i>
Контроль	0 (адаптация)	16,2±5,28	24,3±6,9
	1	8,2 ± 1,7	18,8±6,3
	2	4,0±1,6	4,0±1,9
10 мкМ N-ФНА	1	3,2 ± 1,2	1,1±0,5
	2	1,0 ± 0,0	1,0±0,4
100 мкМ N-ФНА	1	3,0 ± 0,7	0,8±0,3
	2	0,5 ± 0,0	0,6±0,2

Приступая к анализу данных таблицы 2, следует учесть, что в среде роста бактерий в наших экспериментах было низкое содержание углеводного источника питания (0.1%, см. Методику). Эти условия олиготрофного питания на 2-е сут экспозиции приводили к снижению жизнеспособности бактерий уже в клетках их контроля. Внесение в культуральную среду N-ФНА усилило снижение показателей жизнеспособности. Данные в таблице 2 указывают на разный характер и степень влияния N-ФНА на жизнеспособность этих штаммов бактерий. Степень снижения жизнеспособности возрастала с повышением концентрации N-ФНА. Характер реакции на N-ФНА и на повышение его концентрации в ростовых средах у сравниваемых бактерий существенно отличался. Менее всего чувствительными к изменению концентрации от 10 до 100 мкМ N-ФНА оказались ризобии. У азотобактера в контроле наблюдался больший, по сравнению с ризобиями, показатель жизнеспособности. Под влиянием N-ФНА у азотобактера он оказался почти в 3 раза ниже, чем у ризобий уже при его концентрации 10 мкМ, и еще немного снизился при концентрации 100 мкМ.

Представленные результаты позволяют связать усиление снижения жизнеспособности бактерий при концентрации N-ФНА 100 мкМ (табл. 2) с ингибированием процесса его катаболизма при той же его концентрации в бактериальных клетках (табл. 1). Вероятно, при высокой концентрации N-ФНА повышенная аккумуляция его в бактериальных клетках ведет к торможению у них катаболических процессов, ведущих к образованию фталатов. Этому могут способствовать физико-химические свойства соединения, такие как высокая липофильность, благоприятствующая проникновению его через клеточные мембраны, и высокая антиоксидантная активность, которая может быть помехой окислительным процессам при деградации фталатов [11, 25].

Третья группа веществ, которая была в поле зрения наших исследований – фталаты. На роль ростовых регуляторов в микробиоме ризосферы растений для фталатов показывают результаты работ, раскрывших особенности их действия в качестве ингибиторов роста бактерий [10, 22, 28]. Обнаружено, что степень негативного эффекта фталатов определяется не только концентрацией их в среде, но и видом алкильных группировок в их молекулах, присоединенных эфирной связью к *o*-фталевой кислоте, а также зависит от вида бактерий, испытывающих их действие [16]. В работе [28] отмечено неоднозначное действие представителей фталатов на рост бактерий в планктонной культуре и в биопленках. Вместе с тем, многие свободноживущие микроорганизмы способны использовать эфиры *o*-ф-

талевой кислоты в качестве источника углерода и энергии, что дает им определенные селективные преимущества [8].

Данные на рисунках 1 и 2 показали на изменения относительно контроля в составе фталатов, которые возникли под влиянием *Rhizobium* и *Azotobacter* в среде роста корней проростков гороха. При инокуляции ризобиями произошло незначительное увеличение количества дибutilфталата и небольшое снижение процентного отношения диоктил- и диэтилфталатов. Под влиянием азотобактера вместе с уменьшением количества дибutilфталата существенно возросло процентное отношение к нему для трех других видов фталатов. При этом диоктилфталат оказался доминирующим среди представителей обсуждаемой группы веществ. Если принять во внимание данные работ [10, 28], указывавших на антибактериальные свойства диоктил- и диэтилфталатов, можно предположить, что при возникших изменениях в составе фталатов у бактерий *Azotobacter* возник потенциал для повышения их конкурентоспособности.

Изменения соотношений фталатов в среде роста корней проростков гороха под влиянием изучаемых видов бактерий могут происходить вследствие существования у них возможностей для деградирования N-ФНА до образования фталатов и для преобразовывания одних видов фталатов в другие, путем изменения у них длины алкильных цепей, эфирно связанных с *o*-фталевой кислотой. Второе из свойств замечено у некоторых представителей почвенных бактерий авторами работы [8] и подтверждено нашими исследованиями [21]. Способность бактерий преобразовывать одни виды фталатов в другие может служить объяснением несоответствия соотношений между видами фталатов в культуральных средах (табл. 1) и в среде роста корней (рис. 2).

### Заключение

Приведенные результаты свидетельствуют о несхожем характере проявления у проростков гороха растения защитной реакции антимикробной направленности на уровне ризосферы, которое обнаружилось у них при взаимодействии в течении 1 суток с бактериями эндофитного и эпифитного типа сосуществования с ним. Повышение под влиянием *R. leguminosarum* bv. *viciae* содержания соединений негативного действия на бактерии: пизатина, N-ФНА и фталатов в среде роста корней проростков гороха является свидетельством усиления у них защитной реакции. Возможно, это усиление имеет связь с процессами адгезии ризобий на поверхности корней и началом проникивания их в корневые волоски, которые характерны для данного этапа

формирования бобово-ризобияльного симбиоза [6]. Обнаруженное уменьшение количества вышеперечисленных соединений в среде роста корней с бактериями *A. chroococum* показывает на ослабление защитной реакции против бактерий и на возникновение более комфортных условий для существования ризосферных бактерий в прикорневой зоне проростков гороха.

Бактерии *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *A. chroococum*, отличающиеся по активности катаболизма N-ФНА и, по-видимому, различной возможностью для прохождения процесса метаболизации фталатов по  $\beta$ -кетoadипатному пути, в прикорневой области проростков гороха вносили различный вклад в содержание и в состав фталатов.

### **Практические рекомендации**

N-ФНА – это соединение, которое имеет не только биотическое, но и техногенное происхождение (синтезирован химиками и широко используется в различных химических технологиях). Его аккумуляция в окружающей среде может негативно сказываться на животных организмах и на здоровье человека. Приведенные в работе данные по способности деградации N-ФНА у свободноживущих азотфиксирующих бактерий штамма *A. chroococum*, показывающие на его высокую деградирующую активность, позволяют рекомендовать его для применения в качестве компонента биопрепаратов для рекультивации почв, загрязненных соединениями аналогичной структуры (нафталины).

**Информация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest information.** The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Благодарности.** Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам СИФИБР СО РАН А.В. Сидорову за техническую помощь при микроскопических исследованиях бактерий и Н.А. Соколовой и И.Г. Петровой за техническую помощь при проведении ВЭЖХ- и ГХ-МС-анализов.

Аналитическая работа выполнена на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” СИФИБР СО РАН (г. Иркутск). Работа выполнена в рамках проекта под № гос.регистрации АААА-А17-117011810099-8.

**Acknowledgment.** The authors express their deep gratitude to the research members of SIPPB SB RAS, Ph.D. A.V. Sidorov for his technical assistance in microscopic studying of the bacteria, for technical assistance in HPLC and GC-MS analysis, of Sokolova N.A. and Petrova I.G.



Analytical work was performed with the equipment of the Common Use Center 'Bioanalytics' of SIPPB SB RAS (Irkutsk). The work was carried out within the framework of the project under the state registration number AAA-A-17-117011810099-8.

### Список литературы

1. Акимова Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г. Влияние *Azotobacter* на активность пероксидазы и содержание пероксида водорода в корнях проростков гороха, инокулированных *Rhizobium* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7, № 4. С. 126-131. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131>
2. Акимова Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г., Белопухов С.Л. Модуляция про/антиоксидантной активности пероксидазы в корнях проростков гороха, инокулированных *Rhizobium* и *Azotobacter* // Известия ТСХА. 2019. Вып. 1. С. 138-145. <https://doi.org/10.34677/0021-342X-2019-1-138-145>
3. Берестецкий В.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л.: ВНИИ-ИСХМ, 1976. 31 с.
4. Вайшла О.Б., Бондаренко А.А. Пат. № 2231546, Российская Федерация. Штамм бактерий AZ D10 ВКМ В-2272, обладающий ростстимулирующими свойствами и устойчивый к дельтаметрину / Патентообладатель Томский государственный университет; заявл. 28.08.2002; опубл. 27.06.2004.
5. Макарова Л. Е., Петрова И. Г., Соколова Н. А., Мориц А. С. Влияние бактерий *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* и *Pseudomonas syringae* bv. *pisi* на содержание негативных аллелопатических соединений в корневых экссудатах проростков гороха (*Pisum sativum* L.) // Агрехимия. 2020. № 3. С. 62–69. <https://doi.org/10.31857/S0002188120030096>
6. Макарова Л.Е., Нурминский В.Н. Влияние температуры на локализацию «свободных» фенольных соединений в тканях корней и деформацию корневых волосков у инокулированных *Rhizobium* проростков гороха // Цитология. 2005. Т. 47, № 6. С. 519-525.
7. Мельникова Н.Н., Михалкив Л.М., Омельчук С.В., Береговенко С.К. Ризосферные микроорганизмы как фактор регулирования формирования бобово-ризобиального симбиоза // Физиология растений и генетика. 2018. Т. 50, № 4. С. 299-321. <https://doi.org/10.15407/frg2018.04.299>
8. Пастухова Е.С., Егорова В.О., Соколова Н.А., Плотникова Е.Г. Бактерии-деструкторы орто-фталевой кислоты, выделенные из отходов калийного

- производства // Вестник Пермского университета. Биология. 2010. № 3. С. 227-232. <https://rus.neicon.ru/xmlui/handle/123456789/5594>
9. Проворов Н.А., Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза. СПб: Информ-Навигатор, 2012. 400 с.
  10. Alim Al-Bari M.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis* a novel species collected in Bangladesh // Research Journal of Medicine and Medical Sciences. 2006. Vol. 1, N 2. P. 77-81.
  11. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Groot M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Küster E. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants // Environ. Sci. Technol. 2006. Vol. 40, N 19. P. 6163-6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>
  12. Carlson R.E., Dolphin D.H. *Pisum sativum* stress metabolites: two cinnamylphenols and 2'-methoxychalcone // Phytochemistry. 1982. Vol. 21, N 7. P. 1733-1736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85049-8)
  13. Cruickshank I.A.M. Studies of phytoalexins. IY. The antimicrobial spectrum of pisatin // Australian Journal of Biological Sciences. 1962. Vol. 15, N 1. P. 141-159. <https://doi.org/10.1071/BI9620147>
  14. Durham D.R., Stirling L.A., Ornston L.N., Perry J.J. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii* // Biochemistry. 1980. Vol. 19, Issue 1. P. 149-155. <https://doi.org/10.1021/bi00542a023>
  15. Hartwig U.A., Josef C.M., Phillips D.A. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti* // Plant Physiol. 1991. V. 95, N 3. P. 797-803. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.797>
  16. Hauser R., Calafat A.M. Phthalates and human health // Occup Environ Med. 2005. Vol. 62, N 11. P. 806-818. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.797>
  17. Kato-Noguchi H. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum* // Phytochemistry. 2003. Vol. 62, N 7. P. 1141-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00673-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00673-8)
  18. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. Phthalates biodegradation in the environment // Applied Microbiology and Biotechnology. 2008. Vol. 80, Issue 2. P. 183-198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
  19. Makarova L.E., Dudareva L.V., Petrova I.G. The content of phenolic compounds in the pea seedling root exudates depends on size of their roots and inoculation of bacteria mutualistic and antagonistic type of interactions // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2015. V. 11, Issue 3. P. 94-103. [http://www.jspb.ru/issues/2015/N3/JSPB\\_2015\\_3\\_94-103.pdf](http://www.jspb.ru/issues/2015/N3/JSPB_2015_3_94-103.pdf)

20. Makarova L.E., Dudareva L.V., Petrova I.G., Vasil'eva G.G. Secretion of phenolic compounds into root exudates of pea seedlings upon inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* or *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. Vol. 52. P. 205-209. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020095>
21. Makarova L.E., Morits A.S., Sokolova N.A., Petrova I.G., Semenov A.A., Dudareva L.V., Tretyakova M.S., Sidorov A.V. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. Vol. 56. P. 165-173. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>
22. Makarova, L.E., Smirnov, V.I., Klyba, L.V., Petrova, I.G., Dudareva, L.V. Role of allelopathic compounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48. P. 355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>
23. Makoi J.H.R., Ndakidemi P.A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes (review) // African J. Biotechnology. 2007. Vol. 6, N 12. P. 1358-1368. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57520>
24. Mankidy R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. Biological impact of phthalates // Toxicology Letters. 2013. Vol. 217, N 1. P. 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
25. Marek, E.V., Koslitz, S., Weiss, T., Fartasch, M., Schlüter, G., Käßlerlein, H.U. Brüning, T. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatography and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption *ex vivo* under workplace conditions // Arch Toxicol. 2017. Vol. 91. P. 3587-3596. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>
26. Novak K. Production of phytoalexin in pea roots by rhizobia. Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil. Czechslovakia, 1987 / Eds. V. Vančura, F. Kunc. Prague: Academia. 1989. P. 63-66. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70197-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70197-1)
27. Parke D., Ornston L.N. Enzymes of the  $\beta$ - Ketoacid Pathway Are Inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. And Constitutive in Bradyrhizobium spp. // J. Bacteriol. 1986. Vol. 165, N 1. P. 288-292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>
28. Shaficova T.N., Omelichkina Y.V., Enikeev A.G., Boyarkina S.V., Gvildis D.E., Semenov A.A. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation // Doklady Biological Sciences. 2018. Vol. 480. P. 107-109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>

29. Sweigard J.A., Matthews D.E., VanEtten H.D. Synthesis of the phytoalexin pisatin by a methyltransferase from pea // *Plant Physiol.* 1986. Vol. 80, No. 1. P. 277-279. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.277>
30. VanEtten, H.D., Temporini, E., Wassman, C. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? // *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 2001. Vol. 59, N 2. P. 83-93. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0350>

### References

1. Akimova G.P., Verkhoturov V.V., Sokolova M.G. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 126-131. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-4-126-131>
2. Akimova G.P., Verkhoturov V.V., Sokolova M.G., Belopukhov S.L. *Izvestiya TSKhA*, 2019, no. 1, pp. 138-145. <https://doi.org/10.34677/0021-342X-2019-1-138-145>
3. Berestetskiy V.A. *Metodicheskie rekomendatsii po polucheniyu novykh shtamov Rhizobium leguminosarum i otsenki ikh effektivnosti* [Methodical recommendations for obtaining new strains of *Rhizobium leguminosarum* and assessing their effectiveness]. L.: VNIISKhM, 1976, 31 p.
4. Vaishlya O.B., Bondarenko A.A. Patent No. 2231546, Russian Federation. Bacterial strain AZ D10 VKM B-2272, which has growth-stimulating properties and is resistant to deltamethrin / Patented Tomsk State University; app. 28.08.2002; publ. June 27, 2004.
5. Makarova L. E., Petrova I. G., Sokolova N. A., Morits A. S. *Agrokhiimiya*, 2020, no. 3, pp. 62–69. <https://doi.org/10.31857/S0002188120030096>
6. Makarova L.E., Nurminskiy V.N. *Tsitologiya*, 2005, vol. 47, no. 6, pp. 519-525.
7. Mel'nikova N.N., Mikhalkiv L.M., Omel'chuk S.V., Beregovenko S.K. *Fiziologiya rasteniy i genetika*, 2018, vol. 50, no. 4, pp. 299-321. <https://doi.org/10.15407/frg2018.04.299>
8. Pastukhova E.S., Egorov V.O., Sokolova N.A., Plotnikova E.G. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologiya*, 2010. no. 3, pp. 227-232. <https://rus.neicon.ru/xmlui/handle/123456789/5594>
9. Provorov N.A., Vorob'ev N.I. *Geneticheskie osnovy evolyutsii rastitel'no-mikrobnogo simbioza* [Genetic foundations of the evolution of plant-microbial symbiosis]. Spb: Inform-Navigator, 2012, 400 p.
10. Alim Al-Bari M.A., Sayeed M.A., Rahman M.S., Mossadik M.A. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladesiensis* a novel species collected in Bangladesh. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2006, vol. 1, no. 2, pp. 77-81.

11. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Groot M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Küster E. On the mode of action of N-phenyl-2-naphthylamine in plants. *Environ. Sci. Technol.*, 2006, vol. 40, no. 19, pp. 6163-6169. <https://doi.org/10.1021/es060338e>
12. Carlson R.E., Dolphin D.H. Pisum sativum stress metabolites: two cin-namylphenols and 2'-methoxychalcone. *Phytochemistry*, 1982, vol. 21, no. 7, pp. 1733-1736. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(82\)85049-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(82)85049-8)
13. Cruickshank I.A.M. Studies of phytoalexins. IY. The antimicrobial spectrum of pisatin. *Australian Journal of Biological Sciences*, 1962, vol. 15, no. 1, pp. 141-159. <https://doi.org/10.1071/B19620147>
14. Durham D.R., Stirling L.A., Ornston L.N., Perry J.J. Intergeneric evolutionary homology revealed by the study of protocatechuate 3,4-dioxygenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*, 1980, vol. 19, issue 1, pp. 149-155. <https://doi.org/10.1021/bi00542a023>
15. Hartwig U.A., Josef C.M., Phillips D.A. Flavonoid released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.*, 1991, vol. 95, no. 3, pp. 797-803. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.797>
16. Hauser R., Calafat A.M. Phthalates and human health. *Occup Environ Med.*, 2005, vol. 62, no. 11, pp. 806-818. <https://doi.org/10.1104/pp.95.3.797>
17. Kato-Noguchi H. Isolation and identification of an allelopathic substance in *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, 2003, vol. 62, no. 7, pp. 1141-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00673-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00673-8)
18. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 80, issue 2, pp. 183-198. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
19. Makarova L.E., Dudareva L.V., Petrova I.G. The content of phenolic compounds in the pea seedling root exudates depends on size of their roots and inoculation of bacteria mutualistic and antagonistic type of interactions. *J. Stress Physiology & Biochemistry*, 2015, vol. 11, issue 3, pp. 94-103. [http://www.jspb.ru/issues/2015/N3/JSPB\\_2015\\_3\\_94-103.pdf](http://www.jspb.ru/issues/2015/N3/JSPB_2015_3_94-103.pdf)
20. Makarova L.E., Dudareva L.V., Petrova I.G., Vasil'eva G.G. Secretion of phenolic compounds into root exudates of pea seedlings upon inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae or *Pseudomonas siringae* pv. pisi. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2016, vol. 52, pp. 205-209. <https://doi.org/10.1134/S0003683816020095>
21. Makarova L.E., Morits A.S., Sokolova N.A., Petrova I.G., Semenov A.A., Dudareva L.V., Tretyakova M.S., Sidorov A.V. Degradation of N-phenyl-2-naphthylamine by *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, *Pseudomonas*

- syringae pv. pisi, *Clavibacter michiganensis* sps. sepedonicus bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2020, vol. 56, pp. 165-173. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010123>
22. Makarova, L.E., Smirnov, V.I., Klyba, L.V., Petrova, I.G., Dudareva, L.V. Role of allelopathic sompounds in the regulation and development of legume-rhizobial symbiosis. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, vol. 48, pp. 355–362. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030064>
  23. Makoi J.H.R., Ndakidemi P.A. Biological, ecological and agronomic sig-nificance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes (re-view). *African J. Biotechnology*, 2007, vol. 6, no. 12, pp. 1358-1368. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57520>
  24. Mankidy R., Wiseman S., Ma H., Giesy J.P. Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*, 2013, vol. 217, no. 1, pp. 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
  25. Marek, E.V., Koslitz, S., Weiss, T., Fartasch, M., Schlüter, G., Käßlerlein, H.U. Brüning, T. Quantification of N-phenyl-2-naphthylamine by gas chromatog-raphy and isotope-dilution mass spectrometry and its percutaneous absorption ex vivo under workplace conditions. *Arch Toxicol.*, 2017, vol. 91, pp. 3587-3596. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2046-2>
  26. Novak K. Production of phytoalexin in pea roots by rhizobia. Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil. Czechslovakia, 1987 / Eds. V. Vančura, F. Kunc. Prague: Academia. 1989, pp. 63-66. [https://doi.org/10.1016/S0166-2481\(08\)70197-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70197-1)
  27. Parke D., Ornston L.N. Enzymes of the  $\beta$ - Ketoacid Pathway Are Inducible in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. And Constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.*, 1986, vol. 165, no. 1, pp. 288-292. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.288-292.1986>
  28. Shaficova T.N., Omelichkina Y.V., Enikeev A.G., Boyarkina S.V., Gvildis D.E., Semenov A.A. Ortho-phthalic acid esters suppress the phytopathogen capability for biofilm formation. *Doklady Biological Sciences*, 2018, vol. 480, pp. 107-109. <https://doi.org/10.1134/S0012496618030092>
  29. Sweigard J.A., Matthews D.E., VanEtten H.D. Synthesis of the phytoalexin pisatin by a methyltransferase from pea. *Plant Physiol.*, 1986, vol. 80, no. 1, pp. 277-279. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.277>
  30. VanEtten, H.D, Temporini, E., Wassman, C. Phytoalexin (and phytoanti-cipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 2001, vol. 59, no 2, pp. 83-93. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0350>

### **ВКЛАД АВТОРОВ**

**Макаровой Л.Е.** разработана схема проведения исследований и произведено обобщение полученных результатов.

**Макарова Л.Е., Мориз А.С., Капустина И.С.** в равной мере участвовали в проведении экспериментов.

Математическую и статистическую обработку результатов совместно выполнили **Макарова Л.Е.** и **Макаров С.С.**

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

The research scheme was developed and the results obtained were generalized by **L.E. Makarova**.

Equally participated in the experiments **L.E. Makarova, A.S. Morits** and **I.S. Kapustina**.

The mathematical and statistical processing of the results was jointly performed by **L.E. Makarova** and **S.S. Makarov**.

### **ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ**

**Макарова Людмила Евгеньевна**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории физиологии устойчивости растений *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН)*  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
*makarova@sifibr.irk.ru*

**Капустина Ирина Сергеевна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии растительной клетки *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН)*  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация  
*nirinka24@mail.ru*

**Мориз Анна Сергеевна**, ведущий инженер лаборатории физиологии устойчивости растений;  
*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН)*  
ул. Лермонтова, 132, г. Иркутск, 664033, Российская Федерация



**Макаров Святослав Станиславович**, магистрант Института высоких технологий, инженер по автоматизации ИРНТУ, УНПК «Вентиляции и кондиционирования»

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет» (ФГБОУ «ИРНТУ»)*

*ул. Лермонтова, 83, г. Иркутск, 664074, Российская Федерация  
slavaclimat@yandex.ru*

#### **DATA ABOUT THE AUTHORS**

**Lyudmila E. Makarova**, Dr.Sci. (Biology), Principal Research Scientist of the Plant Resistance Physiology Laboratory

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*makarova@sifibr.irk.ru*

*SPIN-code: 4619-9220*

*ORCID: 0000-0002-4582-8245*

*ReseecherID: I-7708-2018*

*Scopus Autor ID: 710272011*

**Irina S. Kapustina**, Ph.D., Senior Researcher of the Plant Cell Laboratory

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

*nirinka24@mail.ru*

*ORCID: 0000-00015159-9816*

*ReseecherID: J-6476-2018*

**Anna S. Morits**, Lead Engineer of the Plant Resistance Physiology Laboratory

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS*

*132, Lermontov Str., Irkutsk, 664033, Russian Federation*

**Sviatoslav S. Makarov**, Master Student

*National Research Irkutsk State Technical University*

*83, Lermontov Str., Irkutsk, 664074, Russian Federation*

*slavaclimat@yandex.ru*

*ORCID: 0000-0002-2145-9502*