

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* ПРИ ВЕРТИКАЛЬНОМ И ГОРИЗОНТАЛЬНОМ ПЕРЕНОСЕ

MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS OF THE VARIABILITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA *BACILLUS* *AMYLOLIQUEFACIENS* DURING VERTICAL AND HORIZONTAL TRANSPORT

E. Khachaturov
D. Polivanov
D. Utkin
N. Shcherbakova
E. Utkin
D. Golubev

Summary. Microorganisms can interact with plants and insects, demonstrating a three-way mutualism between endophytes, plants and pollinating insects. In this study, the movement of an endophytic strain of *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria as a result of horizontal and vertical transfer was studied. The objects of the study were strains of *B. amyloliquefaciens* isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.), rhizosphere soil, honey bee (*Apis mellifera* L.). The variability of the bacterial protein profile was assessed by MALDI-ToF mass spectrometry. Genetic differences were determined by RAPD PCR. It was found that the strains of *B. amyloliquefaciens* isolated from seeds differ significantly in protein and genomic profile from strains isolated from plants and honey bees, due to the difference in the biochemical composition of the studied media.

Keywords: endophytes, horizontal transfer, vertical transfer, RAPD-PCR, MALDI ToF mass spectrometry, *Bacillus amyloliquefaciens*, honey bee.

Хачатуров Эдуард Гариевич

Аспирант, ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»
sitnikov.edick@yandex.ru

Поливанов Дмитрий Алексеевич

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»
dim4ik.polivanov203@gmail.com

Уткин Денис Валерьевич

Д.б.н., проф., ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»
twoduck@yandex.ru

Щербакова Наталья Евгеньевна

Научный сотрудник, ФКУН Российский научно-
исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора (г. Саратов)
hainl@yandex.ru

Уткин Евгений Денисович

ГАОУ СО «Физико-технический лицей № 1» (г. Саратов)
xfunnyduck@yandex.ru

Голубев Дмитрий Михайлович

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»
dimagolubev2018@yandex.ru

Аннотация. Микроорганизмы могут взаимодействовать с растениями и насекомыми, демонстрируя трехсторонний мутуализм между эндофитами, растениями и насекомыми-опылителями. В данном исследовании изучено перемещение эндофитного штамма бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* в результате горизонтального и вертикального переноса. В качестве объектов исследования служили штаммы *B. amyloliquefaciens*, выделенных из душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), почвы ризосферы, пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.). Изменчивость белкового профиля бактерии оценивали методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Генетические различия определяли методом RAPD ПЦР. Установлено, что штаммы *B. amyloliquefaciens*, выделенные из семян, существенно отличаются по белковому и геномному профилю от штаммов, изолированных из растений и медоносных пчел, что обусловлено различием в биохимическом составе исследуемых сред.

Ключевые слова: эндофиты, горизонтальный перенос, вертикальный перенос, RAPD-ПЦР, MALDI ToF масс-спектрометрия, *Bacillus amyloliquefaciens*, медоносная пчела.

Введение

Растения являются хозяевами сложных сообществ эндофитных бактерий, которые колонизируют внутреннюю часть как подземных, так и надземных тканей. Бактерии, живущие внутри растительных тканей в виде эндофитов, могут горизонтально проникать из окружающей среды с каждым новым поколением или вертикально передаваться из поколения в поколение через семена [1]. Лучшее понимание путей колонизации эндофитов и способов их расселения имеет важное значение при изучении взаимодействий растений и эндофитных микроорганизмов как в сельскохозяйственных, так и в природных экосистемах, а также при оценке эффективности тех или иных способов инокуляции биологических препаратов на основе эндофитов.

В формировании микробиоты семян участвуют некоторые ранние микроорганизмы-колонизаторы, которые передаются от материнского растения через сосудистую систему, в то время как другие микробы проникают через рыльца. Таким образом, микробиота семян состоит из микроорганизмов, набранных не только из сосудистых тканей растения, но и из цветка [2]. Известно, что цветы являются центром передачи микроорганизмов между растениями и насекомыми. Этот обмен между растениями и насекомыми открывает возможность для колонизации бактерий, переносимых насекомыми. Опыление насекомыми — это экологический процесс, связанный с передачей бактерий от цветов к семенам.

Микроорганизмы могут взаимодействовать с растениями и насекомыми, демонстрируя трехсторонний мутуализм между эндофитами, растениями и насекомыми-опылителями [3].

В данном исследовании мы отслеживаем перемещение эндофитного штамма бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* от почвы во внутреннюю среду растения, от взрослого растения к цветкам и семенам, от цветков к медоносным пчелам и его молекулярно-биологические характеристики при смене хозяев.

Цель данной работы заключалась в изучении видового разнообразия микробиоты медоносных растений с определением видов эндофитных микроорганизмов, участвующих в горизонтальном и/или вертикальном переносе и выявлении их изменчивости на протеомном и геномном уровне.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования служили 6 изолятов *B. amyloliquefaciens*, выделенных из объектов окружающей среды — душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), почвы ризосферы, пчелы медоносной (*Apis mellifera* L.). Для выделения изолятов эндофитных бакте-

рий различные части растений душицы (листья, стебли, цветки, семена) стерилизовали в смеси 3 %-ной перекиси водорода и 96 %-ного этилового спирта (1:1) в течение 15 мин для удаления поверхностной эпифитной микрофлоры [4]. Образцы трехкратно отмывали от перекиси и спирта в стерильном физиологическом растворе и помещали в стерильные керамические ступки. К растительному материалу добавляли 10 мл стерильного физраствора и перетирали пестиком до получения однородной кашеобразной массы, делали серийные разведения и высевали на поверхность ГРМ агар (ФБУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора) и РУЕ агара [5]. Из почвы делали серийные десятикратные разведения в соответствии с МУК 4.2.3695-21 до 10^{-5} и также высевали на поверхность ГРМ агара. У медоносной пчелы исследовали микробиоту пыльцы обножки и медового зобика. Взрослые рабочие пчелы были собраны в июне 2023 г. с цветков душицы обыкновенной, произрастающей на территории Энгельсского района Саратовской области. Медоносных пчел умерщвляли путем замораживания при температуре минус 25°C в течение 20 минут. Медовые зобики пчел извлекали согласно I. Loncaric et al., содержимое бактериологической петлей переносили в 3 мл физиологического раствора, перемешивали в течение 1 мин, 200 мкл смеси переносили на РУЕ агар [5]. Таким же образом анализировали пыльцу из корзинки пчелы. Наличие пыльцы душицы обыкновенной в обножке подтверждали микроскопическим методом по морфологическим признакам. Культивирование всех образцов осуществляли при температуре 28°C в течение 24–48 ч.

Биохимическую идентификацию видов выделенных штаммов проводили с использованием Руководства Берджи по систематике архей и бактерий [6] и on-line определителя ABIS [7]. Верификацию и определение неидентифицированных видов осуществляли с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии. Для этого из суточной культуры микроорганизмов с одной колонии изготавливали белковые экстракты с использованием этанола, муравьиной кислоты и 80 %-ной трифторуксусной кислоты. Экстракцию проводили в соответствии с МУ 4.2.3.733-21. В качестве матрицы использовали насыщенный водный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, ацетонитрила и 5 %-ной трифторуксусной кислоты. Сбор спектров производился в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программы Flex Control (ver. 3.3). Диапазон масс полученного спектра — 2–20 КДа. Полученные масс-спектры анализировали в программе Biotyper 3 (Bruker Daltonics, Германия). Таксономию исследуемых образцов определяли на основании значения индекса соответствия (score value, SV). Идентификацию белков осуществляли с использованием международной базы белков UniProt [<http://www.uniprot.org/>].

Сравнительный анализ масс-спектров *B. amyloliquefaciens* выполняли в программе mMass ver. 5.5.0 [8]. Построение матрицы бинарных признаков и матрицы различий осуществляли с помощью авторской программы, разработанной на языке Python. Расчет степени различий в белковом составе проводили на основании дистанции коэффициента Жаккара, рассчитанной по формуле:

$$d_j = 1 - c/(a + b - c),$$

где d_j — дистанция Жаккара, a — количество пиков в 1 образце, b — количество пиков во 2 образце, c — количество пиков общих для 1 и 2 образца.

По матрице различий построена дендрограмма методом невзвешенной попарной группировки с усреднением (UPGMA) и методом Уорда (Ward's method) в программе Past ver. 4.04 [9].

Анализ генетического полиморфизма осуществляли с помощью RAPD-анализа (random amplified polymorphic DNA — полимеразная цепная реакция с короткими случайными праймерами). Методом RAPD проведено ДНК-типирование 6 штаммов *B. amyloliquefaciens*, выделенных из почвы, пчел, семян и листьев растений душицы. Взвеси клеток бактерий готовили в 0,9 % растворе хлорида натрия в концентрации, соответствующей 10 единицам отраслевого стандартного образца мутности (СО 42-28-59-85П (10 МЕ), ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), эквивалентной концентрации $1,1 \times 10^8$ КОЕ/мл *Bacillus* sp. ДНК бактерий выделяли с помощью Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия). Для приготовления реакционной смеси использовали набор БиоМастер LR HS-ПЦР (2^х) (Биолаб-микс, Россия). Реакционная смесь для RAPD-ПЦР объемом 25 мкл содержала 14,5 мкл БиоМастер, 0,25 мкМ каждого праймера (Синтол, Россия), 10 мкл анализируемой ДНК. Для проведения RAPD-ПЦР использовали программу амплификации: денатурация 95 °C/2 мин; 5 циклов: денатурация 95 °C/30 с, отжиг 37 °C/30 с, элонгация 68 °C/1 мин; 35 циклов: денатурация 95 °C/20 с, отжиг 37 °C/20 с, элонгация 68 °C/40 с; элонгация 68 °C/2,5 мин. В качестве праймеров использовали два декануклеотида со следующими последовательностями: AGTCAGCCAC, GGGCGGTACT, рекомендованные для типирования бактерий *Bacillus subtilis* [10]. С целью проверки воспроизводимости полученных результатов, эксперимент с использованием праймеров был повторен не менее трех раз. Показана воспроизводимость результатов, получаемых RAPD-методом. Продукты RAPD-ПЦР разделяли в 2 %-ном агарозном геле с бромистым этидием в 1^х TBE-буфере при напряженности электрического поля

5 В/см. Фрагменты ДНК визуализировали с помощью УФ-трансиллюминатора. Для определения длин фрагментов использовали ДНК-маркер Step100 Long (ООО «Биолаб-микс»).

Для оценки степени полиморфизма между изученными штаммами полученные данные были представлены в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов рассматривалось, соответственно, как состояние «1» или «0». По матрице бинарных признаков рассчитана матрица различий с определением дистанции Жаккара (d_j) и построением итоговой дендрограммы в программе Past ver. 4.04 методом невзвешенной попарной группировки с усреднением (UPGMA) и методом Уорда (Ward's method). Уровень полиморфизма оценивали путем деления полиморфных локусов на общее количество фрагментов.

Результаты и обсуждение

Почвенный покров в месте сбора растения представлена типичными темно-каштановыми почвами. Сбор образцов почвы осуществляли на глубине залегания корневища душицы 0–15 см. По результатам микробиологического анализа были выделены и идентифицированы штаммы почвенных микроорганизмов, преимущественно типа Bacillota видов *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*. Из генеративного стебля душицы выделены бактерии вида *B. pumilus*. В листьях генеративного побега обнаружены *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*. Из цветков душицы выделены грамположительные бактерии видов *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus lautus* и грамотрицательная *Pseudomonas chlororaphis*. Для выявления бактерий, переносимых насекомыми-переносчиками в результате горизонтальной передачи, изучен видовой состав микроорганизмов пыльцы корзинки медоносной пчелы (обножка) и содержимого медового зобика. Из пыльцы выделен один вид бактерий *B. amyloliquefaciens*, из медового зобика — виды грамположительных бактерий *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* и грамотрицательные *Citrobacter braakii*, *Serratia* sp., *Pantoea agglomerans*. Ранее было показано, что *P. agglomerans* широко распространена в среде обитания медоносных пчел [5]. Для выявления бактерий, переходящих от родительского организма в дочерние в результате вертикального переноса, исследована эндофитная микробиота семян душицы, собранных после созревания в сентябре 2023 г. В семенах в состоянии покоя обнаружены виды грамположительных бактерий *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus megaterium* и грамотрицательные *Myroides odoratus*, *Delftia acidovorans*, *Brucella grignonense*. Установлено, что бактерии вида *B. amyloliquefaciens* встречаются как в составе ризосферы, так и проникают во внутренние ткани растений душицы (листья), цветки, пыльцу. Также

B. amyloliquefaciens обнаружена в содержимом медового зобика медоносной пчелы, что указывает на возможную передачу указанного эндофита с помощью насекомых-опылителей.

B. amyloliquefaciens используется в сельском хозяйстве для борьбы с корневыми патогенами, кроме того, бактерия снижает концентрацию солей в растительных тканях, продуцирует фитогормон ауксин, α -амилазу, гидролизующую крахмал, протеазу субтилизин.

Отличие в видовом составе микробиоты почвы, растений и насекомых связано с различными физическими и химическими условиями существования микроорганизмов в указанных средах и селективным преимуществом перед другими видами. Наиболее адаптированным видом бактерий, приспособленным к существованию в различных средах, был вид спорообразующей бактерии *B. amyloliquefaciens*.

Для дальнейшей работы были отобраны 6 штаммов *B. amyloliquefaciens*, выделенных из почвы (штамм 30), листьев (штамм 15m), цветков (штамм 2m), семян (штамм 1b), пыльцы (штамм 1m) и медового зобика (штамм 11m). Методом MALDI ToF масс-спектрометрии получены белковые профили указанных штаммов (Рисунок 1).

Для сравнительного анализа отобрано от 90 до 109 пиков в диапазоне 2–20 кДа с относительной интенсивностью более 1 %. Наличие общих и специфических белков определяли в программе mMass. Всего обнаружено 46 общих белков с m/z от 1981±2 Да до 11154±2 Да, присутствующие у всех 6 штаммов. У штаммов 1m, 2m, 11m, 15m наибольшую интенсивность имели пики с m/z 4306±2 Да (белок рибосомы bL36), 5255±2 Да (белок рибосомы bL34), 5897±2 Да (белок рибосомы bL33), 6507±2 Да, 6152±2 Да. У штамма 30 максимальную интенсивность имел белок 6152±2 Да. Масс-спектр штамма 1b существенно отличался от остальных. В его спектре преобладали низкомолекулярные пики с m/z 2078±2 Да, 2094±2 Да, 5279±2 Да, пики рибосомальных белков, но отсутствовал белок 6152±2 Да.

Минимальное различие в белковых спектрах наблюдали у штаммов 1m, 2m, 11m, 15m, 30 (d_j составила от 0,075 до 0,158), максимальное — у штамма 1b из семян с остальными образцами (d_j — от 0,239 до 0,267). По полученной матрице различий проведен иерархический кластерный анализ (Рисунок 2).

Высокий уровень сходства наблюдался у штаммов 2m и 15m, изолированных из органов растения душицы обыкновенной. Ближе всего к этому кластеру последовательно расположились штаммы 11m и 1m, выделенные из медового зобика и пыльцы корзинок пчел, собранных на душице. Наименьшее сходство с данными образцами

имели белковые спектры штамма 30 из почвы и штамма 1b из семян, что указывает на изменение белкового состава вида *B. amyloliquefaciens*.

По результатам RAPD анализа получены RAPD-спектры исследуемых штаммов *B. amyloliquefaciens* (Рисунок 3).

Результаты исследования показали, что 5 из 6 штаммов (1m, 2m, 11m, 15m, 30) имели практически идентичные ПЦР-фингерпринты и содержали 8 общих локуса: 190 п.н., 230 п.н., 390 п.н., 430 п.н., 610 п.н., 760 п.н., 950 п.н., 1080 п.н., из них 3 мономорфных локуса 230 п.н., 390 п.н., 610 п.н. выявлялись и у штамма 1b. Различия в фингерпринтах штаммов 1m, 2m, 11m, 15m между собой отсутствовало ($d_j=0$). У штамма 30 наряду с указанными выше 8 общими локусами наблюдались 2 полиморфных локуса 1290 п.н., 1680 п.н., что отразилось на дистанции Жаккара ($d_j=0,11$). Наибольшим полиморфизмом характеризовался штамм 1b. Различия с группой штаммов 1m, 2m, 11m, 15m составило $d_j=0,647$. У него наблюдались 6 полиморфных локуса: 300 п.н., 660 п.н., 1010 п.н., 1130 п.н., 1290 п.н., 1410 п.н. Уровень полиморфизма штамма 1b составил 66,7 %, штамма 30 — 20 %, у остальных штаммов — 0 %.

Высокий уровень полиморфизма штамма 1b отражен в дендрограммах различий, построенной на основе статистического анализа RAPD-данных (Рисунок 4). Исследованные штаммы разделились на два кластера: в первый кластер вошли штаммы 1m, 2m, 11m, 15m, второй кластер образовали штаммы 30 (из почвы) и 1b (из семян).

Различия в белковом и геномном профиле *B. amyloliquefaciens*, выделенных из семян в состоянии покоя по сравнению с видами, обнаруженными во внутренних средах растений и насекомых, обладающих большей метаболической активностью, вероятно, связано с разным биохимическим профилем изучаемых объектов. Биохимический состав семян, как, собственно, и внешняя среда (почва) менее биологически активен.

В первую очередь, обращают внимание на значительную долю жирных масел в семенах — 28 %; большое содержание полиненасыщенных незаменимых жирных кислот — линолевой и α -линоленовой. Вегетативные органы и соцветия в период цветения биохимически отличаются от семян, в них содержится большое количество эфирных масел (корвакрола, *n*-цимена, α -пинена, мирцена), флавоноидов, дубильных веществ. Ряд из этих веществ обладают бактерицидными свойствами и бактериям необходимо адаптироваться под эти «агрессивные» условия [11]. В частности, корвакрол вызывает изменения в белковом профиле внешней мембраны бактерий [11]. Эфирные масла обуславливают запах цве-

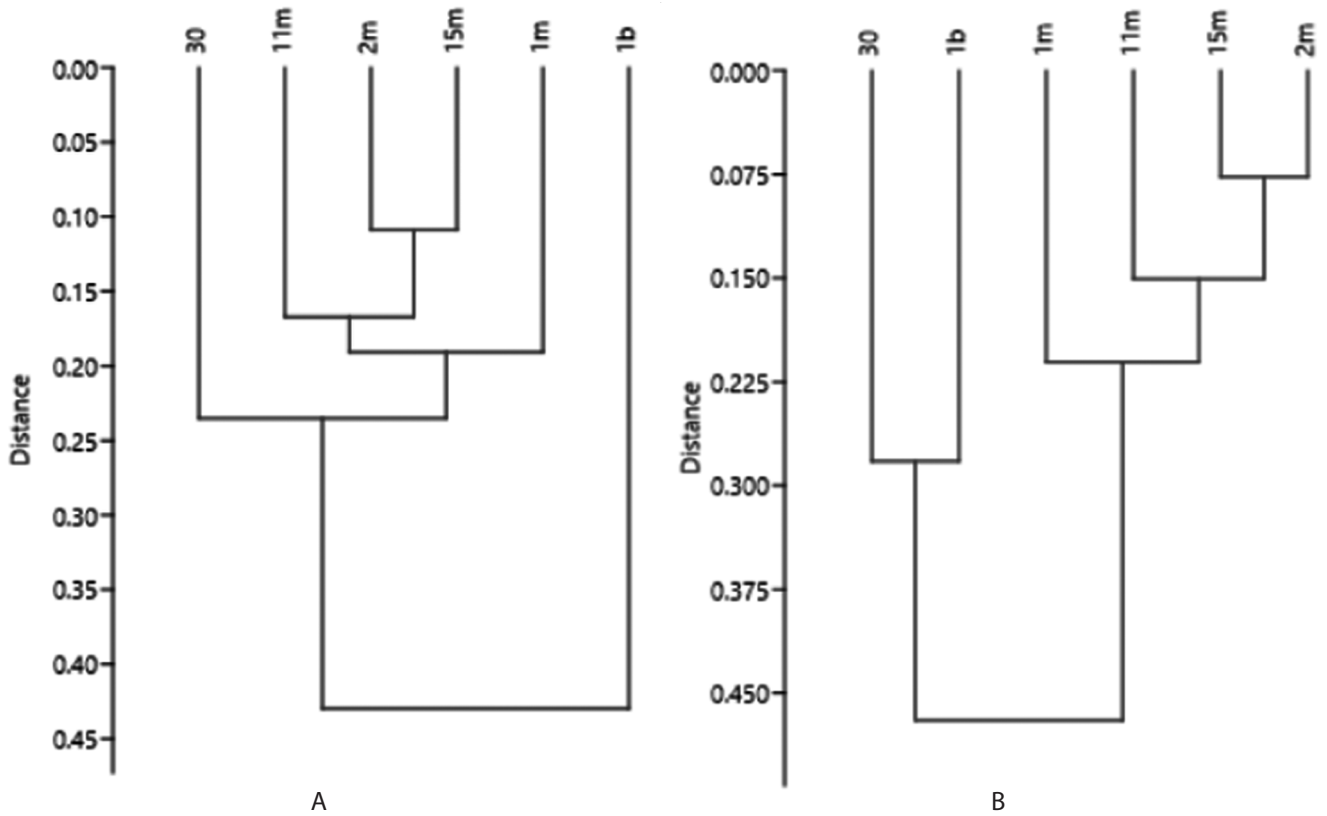
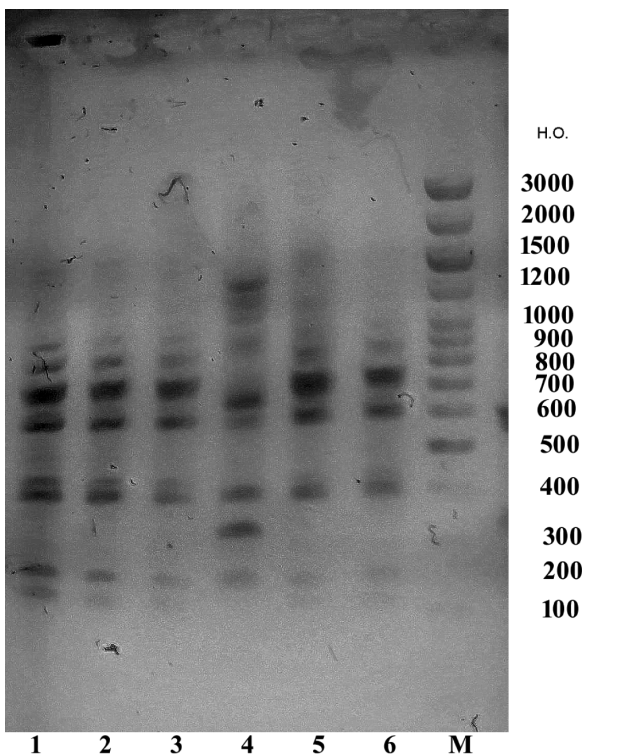


Рис. 2. Дендрограмма на основе различий в масс-спектре исследуемых образцов, построенная по алгоритму UPGMA (А) и методу Уорда (В)



1 — *B. amyloliquefaciens* 1m, 2 — *B. amyloliquefaciens* 2m, 3 — *B. amyloliquefaciens* 11m, 4 — *B. amyloliquefaciens* 1b, 5 — *B. amyloliquefaciens* 30, 6 — *B. amyloliquefaciens* 15m, М — маркер Step100 Long

Рис. 3. RAPD-спектры штаммов *B. amyloliquefaciens*

тов, привлекающий насекомых. Кладовыми эфирных масел в цветках служат железистые пятна на лепестках цветков, железистые волоски на эпидерме цветков и листьев, железки различных типов. С нектаром эфирные масла попадают и в мед, обуславливая его запах. Поэтому наличие в нектаре, а в последующем и в медовом зобике пчелы эфирных масел обуславливает сходство в белковом и геномном профиле бактерий *B. amyloliquefaciens*, выделенных из растений, пыльцы и пчел.

Заключение

В результате работы выделена и идентифицирована микробиота ризосферы, филосферы, антосферы душицы обыкновенной; семян в стадии покоя; медоносной пчелы. Идентифицирован вид бактерии *B. amyloliquefaciens*, присутствующий во всех изученных объектах. Проведенные исследования указывают на возможный вертикальный и горизонтальный перенос почвенных бактерий *B. amyloliquefaciens* и адаптации ее к внутренней среде растения и насекомого. Выявлены различия в белковом и геномном м профиле бактерий *B. amyloliquefaciens* у штаммов, выделенных из растений и насекомых по сравнению со штаммами, изолированными из почвы и семян того же растения (душицы обыкновенной). Указанные различия говорят об адаптационной и генотипической изменчивости штаммов в условиях, отличающихся по биохимическому составу.

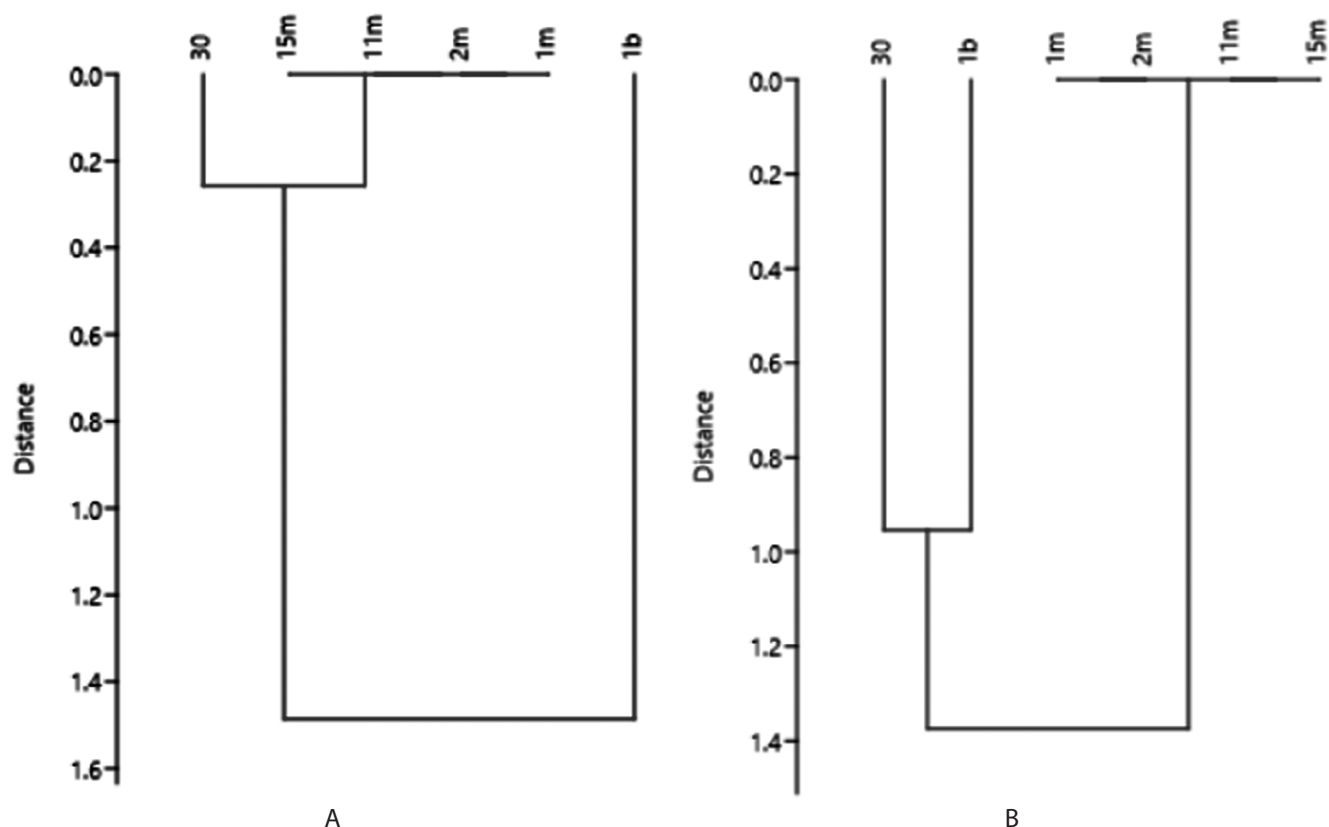


Рис. 4. Дендрограмма на основе различий RAPD фингерпринтов исследуемых образцов, построенная по алгоритму UPGMA (А) и метода Уорда (В)

ЛИТЕРАТУРА

1. Frank, A.C. Transmission of Bacterial Endophytes / A.C. Frank, J.P.S. Guzmán, J.E. Shay // *Microorganisms*. 2017. V. 5, № 4. P. 70–90.
2. Prado, A. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota / A. Prado, B. Marolleau, B.E. Vaissière, M. Barret, G. Torres-Cortes // *Sci Rep*. 2020. V. 10, N 1. P. 3575–3586.
3. Kim, D.-R. A mutualistic interaction between *Streptomyces* bacteria, strawberry plants and pollinating bees / D.-R. Kim, G. Cho, C.-W. Jeon, D.M. Weller, L.S. Thomashow, T.C. Paulitz, Y.-S. Kwak // *Nat Commun*. 2019. V. 10, N 1. P. 4802–4812.
4. Широких, А.А. Выделение и оценка биорегуляторных свойств эндофитных бактерий / А.А. Широких [и др.] // *Теоретическая и прикладная экология*. 2008. № 3. С. 73–80.
5. Lončarić, I. Typing of *Pantoea* agglomerans isolated from colonies of honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey / I. Lončarić, H. Heigl, E. Licek, R. Moosbeckhofer, H.-J. Busse, R. Rosengarten // *Apidologie*. 2009. V. 40. P. 40–54.
6. Whitman, W.B. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*. 2015. — <https://doi.org/10.1002/9781118960608>.
7. Advanced Bacterial Identification Software. [Электронный ресурс]. URL: https://tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html. (дата обращения 20.02.2024).
8. Niedermeyer, T.H.J. mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra / T.H.J. Niedermeyer, M. Strohaln // *PLoS ONE*. 2012. V. 7, N 9, e44913 DOI:10.1371/journal.pone.0044913.
9. Hammer, Ø. PAST: Paleontological Statistica software package for education and data analysis / Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // *Paleontologia*. 2001. V. 4, N 1. 9 pp.
10. Терлецкий, В.П. Оценка возможностей метода RAPD-PCR для генетической идентификации штаммов *B. subtilis* / В.П. Терлецкий // *Journal of Agriculture and Environment*. — 2023. — №11 (39). — С.1–4. URL: <https://jae.cifra.science/archive/11-39-2023-november/10.23649/JAE.2023.39.5> (дата обращения: 21.04.2024). — DOI: 10.23649/JAE.2023.39.5
11. Hyldgaard, M. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components / M. Hyldgaard, T. Mygind, R.L. Meyer // *Frontiers in Microbiology*. 2012. V. 3, A. 12. P. 1–24.

© Хачатуров Эдуард Гариевич (sitnikov.edick@yandex.ru); Поливанов Дмитрий Алексеевич (dim4ik.polivanov203@gmail.com);

Уткин Денис Валерьевич (twoduck@yandex.ru); Щербакова Наталья Евгеньевна (hainl@yandex.ru);

Уткин Евгений Денисович (xfunnyduck@yandex.ru); Голубев Дмитрий Михайлович (dimagolubev2018@yandex.ru)

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»