

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрабина Российской академии наук
АНО Исследовательский центр «Биоресурсы и экология»

**IV Пущинская школа-конференция
«Биохимия, физиология и биосферная
роль микроорганизмов»**

4-8 декабря 2017

Материалы конференции

Пушино – 2017

УДК 579.22

ББК 28.4

Под редакцией д.б.н. *Решетиловой Т.А.*

Тезисы докладов одобрены программным комитетом и издаются
в авторской редакции

IV Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов/ под редакцией д.б.н. Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017.

ISBN 978-5-9909335-3-8

В сборнике представлены расширенные тезисы устных и постерных сообщений по материалам работ в области микробиологии и биотехнологии, выполненных в научных учреждениях и университетах страны.

Конференция направлена на широкий обмен информацией в смежных областях микробиологических исследований – распространение микроорганизмов, включая обитателей слабоизученных экстремальных экосистем, их генетическое, биохимическое и структурно-функциональное разнообразие, новые биоаналитические методы, биотехнологические разработки. Изучение микробного разнообразия и его ресурсов, структуры микроорганизмов, молекулярных механизмов функционирования их генетических систем является реальным фундаментом генерации новых биологических знаний и создания принципиально новых технологий.

УДК 579.22

ББК 28.4

ISBN 978-5-9909335-3-8

©Авторы тезисов,2017

©ООО «ИД «Вода: химия и экология»

СОДЕРЖАНИЕ

Процессы биоминерализации и преобразования глинистых минералов при взаимодействии с цианобактериями <i>Алексеев А.О., Алексеева Т.В.</i>	7
Активность ферментов почв и речных донных отложений, загрязненных тяжелыми металлами <i>Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Башкин В.Н.</i>	9
Влияние лектина молочнокислых бактерий на цитокиновую активность фагоцитов <i>Долмашкина А.С., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В.</i>	10
Генетические детерминанты и функциональные маркеры в геномах бактерий рода <i>Pseudomonas</i> , из ассоциаций с байкальскими гидробионтами <i>Клименко Е. С., Белькова Н. Л.</i>	11
Образование биопленки молочнокислыми бактериями <i>Тяпкин А.Ю., Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В.</i>	14
Биологическая активность экзополисахаридов молочнокислых бактерий <i>Урядова Г.Т., Фокина Н.А., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В., Маслякова В.А., Александрова С.С., Позднякова О.И.</i>	15
Белки параспоральных кристаллов <i>Bacillus thuringiensis</i> – функциональные амилоиды <i>Юдина Т.Г., Даньян Го, Чен Л., Полянская А.Б., Нетрусов А.И.</i>	16
Выделение и особенности структурно-функциональной организации радиоустойчивых бактерий <i>Абашина Т.Н., Сузина Н.Е., Шорохова А.П.</i>	18
Образование фунгицидных пептидов штаммом <i>Paenibacillus peoriae</i> MBV-2 <i>Абашина Т.Н., Лауринавичюс К.С., Вайнштейн М.Б.</i>	19
Новые виды аэробных метилотрофных бактерий: <i>Methylobacillus methanolivorans</i> sp. nov. и <i>Metahylobacillus caricis</i> sp. nov. <i>Агафонова Н.В., Капарулина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.</i>	21
Неорганические полифосфаты у метилотрофных дрожжей <i>Андреева Н.А., Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Кулаковская Т.В.</i>	22
Новый пиридиновый алкалоид гриба <i>Aspergillus cavernicola</i> <i>Антипова Т.В., Зайцев К.В., Жеребкер А.Я., Тафеенко В.А., Баскунов Б.П., Желифонова В.П., Иванушкина Н.Е., Николаев Е.Н., Козловский А.Г.</i>	24
Локализация редуктазных активностей у анаэробов-носителей метакрилатной редокс системы <i>Архипова О.В., Бирюкова Е.Н., Хохлова Г.В., Абашина Т.Н., Ашин В.В., Микулинская Г.В.</i> ...25	25
Выделение и свойства L-лактатоксидазы дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i> ВКМ У-2378 <i>Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i>	27
Разложение компонентов нефти почвенными бактериями <i>Борзова О.В., Фунтикова Т.В., Егозарьян Н.С., Поливцева В.Н., Пунтус И.Ф., Сузина Н.Е., Головлёва Л.А., Соляникова И.П.</i>	30
Кристаллизация и рентгеноструктурный анализ 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы мыши <i>Буренков Г., Дубова К.М., Карпов М.В., Николаева В.М., Самыгина В.Р., Стрижов Н.И.</i>	32
Глюкоза вызывает некроз I типа у дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Валиахметов А.Я., Звонарёв А.Н., Абашина Т.Н.</i>	32
Гетерологическая экспрессия ароматазы и P450-оксидоредуктазы человека в бактериях <i>Escherichia coli</i> <i>Гарцева А.С., Николаева В.М., Карпов М.В., Донова М.В., Стрижов Н.И.</i>	34

Разработка способа биоремедиации грунтов в жарком аридном климате с использованием термотолерантных актинобактерий <i>Делеган Я.А., Чернявская М.И., Филонов А.Е.</i>	36
Микробные консорциумы на основе капсулообразующих микроорганизмов <i>Дмитриев В.В., Звонарев А.Н.</i>	38
Окисление холестерина мутантами <i>Mycobacterium smegmatis</i> с инактивированными генами KstR2 - регулона <i>Довбня Д.В., Брагин Е.Ю., Ивашина Т.В., Донова М.В.</i>	39
Воздействие ионизирующего излучения на динамику видов микроорганизмов в мясном фарше <i>Дороничев Ф.В., Кобялко В.О., Исамов Н.Н., Саруханов В.Я., Полякова И.В., Губарева О.С., Фролова Н.А., Лауринавичюс К.С.</i>	42
Динамика доминирования видов микроорганизмов в пищевых пресервах сельди после радиационной обработки <i>Дороничев Ф.В., Кобялко В.О., Исамов Н.Н., Саруханов В.Я., Полякова И.В., Губарева О.С., Фролова Н.А., Лауринавичюс К.С.</i>	42
Предварительный рентгеноструктурный анализ 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы мыши <i>Дубова К.М., Самыгина В.Р., Карпов М.М., Николаева В.М., Стрижов Н.И.</i>	43
Функциональные особенности серинового цикла у метанотрофов <i>Егорова С.В., Бут С.Ю., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А.</i>	44
Транскрипционная регуляция гена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы у <i>Methylobacterium radiotolerans</i> <i>Екимова Г. А.</i>	46
Особенности кривых ответ-концентрация для модели амперометрического микробного сенсора на мальтозу <i>Емельянова Е.В., Решетиллов А.Н.</i>	48
Особенности наследования плазмид биodeградации ϵ -капролактама и нафталина в почвенных и ризосферных штаммах псевдомонад <i>Есикова Т.З., Анохина Т.О., Ахметов Л.И., Кошелева И.А.</i>	50
Гетерологичная экспрессия генов анаэробной метакрилатной редокс системы <i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1 <i>Захарова М.В., Микулинская Г.В., Архипова О.В.</i>	54
Железовосстанавливающие экстремофильные прокариоты и их бактериальные спутники из холодных мест обитания <i>Захарюк А.Г., Щербакова В.А.</i>	56
Гомологи фаговых антигенов и фаговых полинуклеотидлигаз среди белков морской микробиоты <i>Зимин А.А., Назипова Н.Н.</i>	57
Бактериофаги <i>P.aeruginosa</i> из ЖКТ зубров и бизонов: первичный анализ <i>Зимин А. А., Сузина Н.Е., Никулин Н.А., Кононенко С.И., Землянко И.И., Скобликов Н.Э.</i>	59
Вирусоподобная частица с признаками фага из семейства Tectiviridae в лизате протей <i>Зимин А.А., Чугунова Е.О., Сузина Н.Е.</i>	61
NCR118: эволюционный интермедиат эндонуклеазы рестрикции EcoRII типа II <i>Ибряшкина Е.М., Солонин А.С., Захарова М.В.</i>	63
Анализ генов деградации алифатических и ароматических углеводов нефти у микроорганизмов-деструкторов Финского залива <i>Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А.</i>	65
Новые бактериофаги инфицирующие бактерии группы <i>Bacillus cereus</i> <i>Казанцева О.А., Загородный В.А., Кулябин В.А., Пилигримова Э.Г., Солонин А.С., Шадрин А.М.</i>	67

Селекция активных продуцентов лимонной кислоты из глюкозо-содержащего сырья и оптимизация условий их культивирования <i>Камзолова С.В., Лунина Ю.Н., Римович В., Афонин А.В., Моргунов И.Г.</i>	69
Влияние мутаций в генах гликозилгидролаз на продукцию низкомолекулярных экзополисахаридов и симбиотические свойства штамма <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VF39 <i>Канатина А.Ш., Марченков В.В., Сурин А.К., Ашина Н.П., Шляпников М.Г., Ивашина Т.В.</i> ...	71
Пути метаболизма метанола и метиламина у нового грамположительного факультативного метилотрофа из рода <i>Rhodococcus</i> <i>Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Доронина Н.В.</i>	73
Иммобилизованные актинобактерии <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> ВКМ Ас-2782 как основа для определения орто-фталата натрия в водной среде <i>Кувичкина Т.Н., Гридина В.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Решетилов А.Н.</i>	74
Регуляция трансформации целлобиозы путем взаимодействия целлобиозо-дегидрогеназы и бета-глюкозидазы гриба <i>Cerrena unicolor</i> <i>Лисов А.В., Белова О.В., Винокурова Н.Г., Леонтьевски А.А.</i>	76
Получение новых ферментных препаратов методом геномного скрининга <i>Лисов А.В., Белова О.В., Лисова З.А., Самойленко В.А., Андреева-Ковалевская Ж.И., Назорных М.О., Захарова М.В., Шадрин А.М., Солонин А.С., Леонтьевский А.А.</i>	77
Особенности трансформация стероидов умеренно термофильным штаммом <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> ВКМ Ас-666 <i>Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	77
Зачем грибы <i>Trichoderma</i> синтезируют внеклеточную L-лизин α-оксидазу? <i>Макрушин К.В., Баскунов Б.П., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.</i>	79
Метод теоретического определения величины максимального выхода биомассы <i>Минкевич И.Г.</i>	81
Изучение антиоксидантных свойств изолимонной кислоты в модели окислительного стресса, индуцированного действием перекиси водорода на <i>Paramecium caudatum</i> и <i>Yarrowia lipolytica</i> <i>Моргунов И.Г., Камзолова С.В., Карпухина О.В., Лунина Ю.Н., Аллаяров Р.К., Самойленко В.А., Иноземцев А.Н.</i>	81
Глюкокиназа – ключевой фермент метаболизма запасных углеводов у метанотрофа <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> 20Z <i>Мустахимов И.И.</i>	84
Характеристика продуцентов биоПАВ, выделенных из поверхностных вод и седиментов Балтийского моря <i>Петриков К.В., Ветрова А.А., Иванова А.А., Делеган Я.А., Гафаров А. Б., Соколов С.Л.</i>	84
Изучение электрохимических свойств углеродных волокнистых наноматериалов для создания микробных топливных элементов <i>Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.</i>	87
Получение фармацевтической субстанции такролимуса: полный цикл биосинтеза и очистки <i>Пошехонцева В.Ю., Фокина В.В., Салионов Д.С., Шутов А.А., Донова М.В.</i>	88
Потребление лактата пропионовокислыми бактериями в условиях рубца крупного рогатого скота <i>Рыжманова Я.В., Автух А.Н., Щербакова В.А.</i>	90
Ингибирование роста и миграции раковых клеток полимерами гентизиновой кислоты <i>Рыццов Г. К., Лисов А.В., Леонтьевский А. А., Земскова М. Ю.</i>	92
Особенности динамики титра колифагов нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни <i>Скобников Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.</i>	93
Особенности динамики титра коли-титра нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни <i>Скобников Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.</i>	94

Доля фагов T4-типа среди колифагов нормофлоры гусят в первые семь недель жизни Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.....	94
Динамика роста, синтеза липидов и пальмитолеиновой кислоты у дрожжей <i>Debaryomyces globosus</i> ВКМ У-9539 Степанова Н.Н., Миронов А.А., Моргунов И.Г.....	96
Одностадийный микробиологический процесс получения тестостерона из фитостерин Суходольская Г.В., Карпов М.В., Николаева В.М., Шутов А.А., Фокина В.В., Стрижов Н.И., Донова М.В.....	98
Точечные мутации в Н ⁺ -АТФазе плазматической мембраны дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : влияние на неорганические полифосфаты Томашевский А.А., Петров В.В.....	100
Роль гена METD15511 в адаптации клеток <i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> DM4 к использованию дихлорметана Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е.....	102
Устойчивость штаммов <i>Saccharomyces cerevisiae</i> с генетически измененными уровнями полифосфатаз к действию ионов кадмия Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Кулаковская Т.В.	104
Сравнительная геномика бактерий <i>Sphaerochaeta</i> Трошина О.Ю., Ошуркова В.И., Бочкарева О.О., Драненко Н.О., Щербакова В.А.....	105
Двухдоменная лакказа бактерии <i>Streptomyces anulatus</i> ВКМ Ас-728 – получение, свойства, взаимодействия с гуминовыми веществами. Трубицина Л.И., Лисова З.А., Трубицин И.В., Лисов А.В., Заварзин А.Г., Леонтьевский А.А.....	107
Микробиологический анализ многолетнемерзлых отложений острова Западный Шпицберген Трубицын В.Э., Рыжманова Я.В., Спирина Е.В., Лауринавичюс К.С., Ривкина Е.М., Щербакова В.А.....	108
Влияние концентрации железа на регуляцию экспрессии генов деградации салицилат-иона штамма <i>Pseudomonas putida</i> АК5 Филатова И.Ю., Захарова М.В.....	109
Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий приаральского региона с использованием новых биопрепаратов Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Фунтикова Т.В., Делеган Я.А.....	109
Участие транскрипционного фактора NahR в регуляции <i>sgp</i> -оперона штамма <i>Pseudomonas putida</i> АК5 Фролова А.А., Фунтикова Т.В., Филатова И.Ю.....	112
Генетический контроль деградации замещенных салицилатов у штамма <i>Pseudomonas putida</i> АК5 Фролова А.А., Филатова И.Ю., Захарова М.В.....	113
Новые изоляты метилотрофов рода <i>Methylophila</i> и распространение вида <i>Methylophila oligotropha</i> Чемодурова А.А., Капаруллина Е.Н.....	115
Новый аскомицет <i>Thielavia ovispora</i> - активный продуцент лакказ Шебанова А.Д., Самойлова А.С., Головлева Л.А.....	116
Устойчивость интродуцированных микроорганизмов в открытой проточной систем Шкидченко А.Н., Иванова А.А., Ветрова А.А.....	117
Галоалкалофильный метилотроф <i>Methylophaga muralis</i> Вур 1, выделенный из содового озера Хилганта (Южное Забайкалье, республика Бурятия) Шмарева М. Н., Доронина Н. В., Тарлачков С. В., Василенко О. В., Троценко Ю.А.....	118

Процессы биоминерализации и преобразования глинистых минералов при взаимодействии с цианобактериями

Алексеев А.О., Алексеева Т.В.

ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения
РАН, г. Пущино; alekseev@issp.pbcra.ru

Обнаруженные остатки фоссилизированных микроорганизмов свидетельствуют о том, что их сообщества были важнейшим фактором осадкообразования на поверхности Земли, начиная с архея. Исследования последних лет выявили огромную роль бактерий, в том числе цианобактерий в процессах древнего седиментогенеза. Первые несомненные остатки литифицированных цианобактериальных сообществ в виде строматолитов, обнаружены в формациях, возраст которых 3-3.5 млрд лет. В фанерозое появление и развитие скелетных организмов вытеснило цианобактерии в отдельные экологические ниши с экстремальными условиями – районы с активной гидротермальной деятельностью, в гиперсолёные лагуны морей, щелочные озера. Именно в этих условиях и в настоящее время продолжают развиваться реликтовые прокариотные сообщества. С деятельностью цианобактерий связано образование большого числа минералов, таких как карбонаты, силикаты в том числе и глинистые минералы, оксиды-гидроксиды железа и марганца, фосфаты, сульфиды. На настоящий момент наиболее изучены галофильные и особенно термофильные цианобактериальные маты. По алкалофильным матам имеются единичные работы. Вместе с тем вплоть до позднего палеозоя на суше господствовали нейтральные и щелочные среды, что вызывает дополнительный интерес к алкалофильным сообществам. Исследования древних пород свидетельствуют, что при накоплении глинистых осадков бактерии, с одной стороны, могут играть роль организатора транспорта глинистых частиц на дно, а с другой быть катализаторами образования аутигенных минералов в слизистых чехлах цианобактерий. В тонкодисперсном осадочном материале бактерии и другие живые организмы способствуют появлению тех форм и локальных концентраций вещества, которые достаточны для начала кристаллизации минералов.

В рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Проблемы происхождения жизни и становления биосферы» проведены эксперименты по искусственной фоссилизации (литификации) цианобактерий *Microcoleus chthonoplastes*, *Rhabdoderma sp.* и *Oscillatoria terebriformis* и изучены связанные изменения минерального состава глинистых минералов под влиянием продукционных и деструкционных процессов циано-бактериального сообщества. Интенсивность процессов выветривания и их направленность, в том числе и с участием биоты, определяется структурой и составом минерала. Поэтому наше исследование имело целью сравнить воздействие алкалофильного циано-бактериального сообщества в динамике (7, 14, 28 и 60 суток) на глины, содержащие слоистые силикаты со структурой 1:1 (каолиновая глина), 2:1 ненабухающие (иллит), 2:1 набухающие (бентонитовая глина), а также цеолит и ленточный силикат палыгорскит. Глинистые минералы – алюмосиликаты со слоистой структурой – наиболее распространенные минералы седиментационных бассейнов (морских и континентальных), кор выветривания и почв. Основу их структуры составляют тетраэдрический (кремнекислородный) и октаэдрический (катионы металлов и кислород) слои. Общим, специфическим для глинистых минералов свойством является высокая дисперсность и, как следствие, малый размер частиц (как правило, менее 1 мкм) и большая удельная поверхность, что обеспечивает их высокую реакционную способность – сорбционную и каталитическую, а также емкость катионного обмена. Частое присутствие в их структуре ионов с переменной валентностью (Fe, Mn и др) делает глинистые минералы исключительно чувствительными к окружающим условиям и прежде всего к изменениям pH и окислительно-восстановительной обстановки среды, что дает

возможность использовать эти минералы в качестве индикаторов состояния окружающей среды.

Для каждой точки эксперимента были изучены параметры биологической активности, состав растворов и состав твердой фазы: содержание органического углерода, минералогический состав, химический состав. Характер взаимодействия алкалофильных цианобактерий с глинами на разных этапах эксперимента изучен методами оптической и сканирующей электронной микроскопии. Полученные результаты свидетельствуют, что под воздействием щелочного циано-бактериального сообщества (*Microcoleus chthonoplastes*, *Rhabdoderma* sp) имеют место процессы преобразования глинистых минералов и содержащихся в них примесей оксидов(гидроксидов) железа. Фиксируются процессы минерального растворения и неосинтеза. Изученные глинистые минералы претерпевают изменения в разной степени. Преобразования глинистых минералов, происходящие при активном фотосинтезе цианобактерий (до 14 суток) и при деструкции органической массы (28-60 суток) принципиально различаются. На стадии продукции биомассы имеют место процессы растворения силикатов и оксидов (вынос Si и Fe), вынос обменных оснований (K). Данные процессы отмечены для смектит -цеолита и иллита и не характерны для каолина и бентонита. В случае смектит –цеолита и иллита растворение силикатов (вынос Si) и вынос обменного калия фиксируются также. На этапе деструкции ОВ более характерными, являются процессы неосинтеза – формирование карбонатов (предположительно сидерита для бентонитовой глины и Mg – кальцита для каолиновой глины) и переход ферригидрита в термодинамически более устойчивый гетит. Жизнедеятельность обоих видов цианобактерий оказала влияние на состав примесей железосодержащих оксидов и привела к формированию аутигенных минералов железа. Последние эксперименты с палыгорскитом и *Oscillatoria terebriformis* показали, что в процессе взаимодействия бактерий с глиной не отмечается существенных изменений в структуре палыгорскита по данным рентгеновской дифрактометрии. Наблюдается только частичное конгруэнтное растворение минерала. На стадии продукции биомассы имеют место процессы растворения силиката (вынос Si и Fe), вынос обменных оснований (K). В ходе экспериментов на стадии фоссилизации бактерий (30–45 суток) по данным рентгеновской дифрактометрии фиксируется новообразование магнезиальных кальцитов. Микро- геохимическое профилирование при электронно-микроскопических исследованиях также показало повышенную концентрацию Ca и Mg на контакте клеток с глиной. Обнаружены микроконкреции кальцита приуроченные к трихомам цианобактерий.

Таким образом, показано, что цианобактерии оказывают влияние на слоистые силикаты. Направленность процессов преобразования зависит от минералогического состава глины и видоспецифична. Преобразования происходят в короткие сроки (первые 15-60 суток). Изменения глинистых минералов, происходящие при активном фотосинтезе цианобактерий (до 14 суток) и при деструкции органической массы (28-60 суток) различаются. На стадии продукции биомассы имеют место процессы растворения силикатов и оксидов. Обнаруживаются процессы неосинтеза– формирование карбонатов в случае экспериментов с каолинитом, бентонитом и палыгорскитом.

Активность ферментов почв и речных донных отложений, загрязненных тяжелыми металлами

Галиулин Р.В.¹, Галиулина Р.А.¹, Башкин В.Н.²

¹ ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пушкино
galiulin-rauf@rambler.ru

² ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
г. Пушкино

Известно, что при техногенезе тяжелые металлы попадают в почвы в составе газопылевых выбросов и атмосферных осадков, а в речные донные отложения поступают с промышленными сточными водами и стоками, выщелачивающими техногенные образования (отвалы и терриконы забалансовых руд и минерализованных пород, шлако- и золоотвалы). При этом тяжелые металлы могут загрязнять почвы и речные донные отложения при двух различных сценариях: хронически, постоянно, а также при авариях, «залпом». В условиях формирования подобного рода геоэкологических ситуаций важно осуществлять диагностику хронического и аварийного загрязнения почв и речных донных отложений тяжелыми металлами, особенно на территориях с высокой техногенной нагрузкой, что необходимо для принятия соответствующих профилактических и ремедиационных мер. К числу таких территорий можно отнести г. Челябинск, характеризующийся значительной концентрацией объектов черной и цветной металлургии, машиностроения и энергетики в пределах его границ.

Цель настоящей работы заключалась в диагностике хронического и аварийного загрязнения тяжелыми металлами прибрежных почв и донных отложений р. Миасс, дренирующей территорию Челябинска, посредством анализа активности ферментов из класса оксидоредуктаз - каталазы и дегидрогеназы.

На первом этапе исследования отбирали репрезентативные образцы прибрежных почв и донных отложений (слой 0-15 см) по ходу течения р. Миасс на 2-х участках - в Центральном и Металлургическом районах Челябинска для оценки их хронического загрязнения тяжелыми металлами. Анализ содержания в почвах и донных отложениях тяжелых металлов (Cu, Ni и Pb) проводили атомно-абсорбционно-спектрофотометрическим методом. На втором этапе исследования имитировали аварийное поступление Cu, Ni и Pb как отдельно, так и в виде их смеси, путем внесения в образцы почв и донных отложений водных растворов CuSO₄, NiCl₂·6H₂O и Pb(NO₃)₂ в дозах 100 и 500 мг/кг. На первом и втором этапах исследования образцы почв и донных отложений инкубировали в чашках Петри при влажности 70% от полной влагоемкости в термостате (30°C), соответственно, до 40 и 20 сут, а активности каталазы и дегидрогеназы осуществляли, соответственно, газометрическим и спектрофотометрическими методами.

Исследования показали, что содержание Cu, Ni и Pb в почвах и донных отложениях увеличивалось по ходу течения р. Миасс от Центрального к Металлургическому району: соответственно, Cu от 34,8 до 82,1 и от 41,2 до 265,0 мг/кг; Ni от 48,9 до 86,6 и от 67,2 до 109,9 мг/кг; Pb от 14,8 до 67,6 и от 28,0 до 335,6 мг/кг. Как видно в Металлургическом районе нагрузка тяжелых металлов была больше на донные отложения, чем на почву, как результат их доминирующего поступления промышленными сточными водами. При этом была установлена статистически доказанное увеличение активности каталазы и дегидрогеназы, а также численности микроорганизмов почв и донных отложений по ходу течения р. Миасс с возрастанием в них содержания тяжелых металлов. Это свидетельствует об адаптации микроорганизмов к хроническому загрязнению почв и донных отложений тяжелыми металлами путем естественного отбора резистентных форм, что требовало определенной затраты времени и было выражено в увеличении продолжительности лаг-фазы [Кобзев, 1980]. В ходе адаптации микроорганизмов к тяжелым металлам происходит перестройка их метаболизма, т.е. замедление

чувствительных к действию тяжелых металлов процессов (дыхания и накопления внутриклеточного АТФ) и усиление процессов, направленных на снижение токсичности металлов (сорбции металлов клеточными оболочками и восстановления их ионов до элементарной, металлической формы).

Противоположная закономерность изменения активности ферментов складывалась при аварийном загрязнении почв и донных отложений Cu и Ni. Так, отмечалась четко выраженная тенденция возрастания ингибирования активности каталазы с повышением дозы Ni (от 100 до 500 мг/кг) как в почвах, так и донных отложениях. К концу наблюдения (на 20-е сут) активность фермента в почве относительно контрольного варианта (без внесения солей тяжелых металлов) ингибировалась под действием Ni и смеси Cu, Ni и Pb в дозе 500 мг/кг соответственно на 16 и 19%, а в донных отложениях – на 23 и 25%. Действие Pb, вносимого в форме азотнокислой соли, на активность каталазы почвы было стимулирующим в начале наблюдения (на 5-е сут), как проявление анионного эффекта вследствие поступления легкодоступного источника азота для микроорганизмов.

Однако в отличие от каталазы активность дегидрогеназы изменялась при аварийном загрязнении Cu, а также смесью Cu, Ni и Pb, т.е. отмечалась четко выраженная тенденция возрастания ингибирующего эффекта активности дегидрогеназы с повышением дозы Cu (от 100 до 500 мг/кг). При этом ингибирование активности фермента в почве и донных отложениях Cu и смесью Cu, Ni и Pb в максимальной дозе составило соответственно 50 и 56%, 43 и 60% к концу наблюдения (на 20-е сут). Как и в случае каталазы, в начале наблюдения (на 5-е сут) отмечен стимулирующий эффект азотнокислого свинца на активность дегидрогеназы в донных отложениях.

В целом снижение активности ферментов под действием аварийного загрязнения Ni и Cu почвы и донных отложений объясняется как прямым ингибированием каталитической активности каталазы и дегидрогеназы, так и задержкой их синтеза микроорганизмами при подавлении роста последних [Раськова и др., 1983]. Неоднозначное действие Ni и Cu на активность каталазы и дегидрогеназы позволяет сделать заключение об этих металлах как специфических ингибиторах данных ферментов, участвующих в различных биохимических реакциях.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что диагностика хронического загрязнения Ni и Cu, как отдельно, так и смесью металлов (Cu, Ni и Pb) почв и речных донных отложений территории с высокой техногенной нагрузкой, вполне осуществима посредством анализа активности каталазы и дегидрогеназы. Аварийное загрязнение почв и донных отложений названными металлами и их смесью четко диагностируется посредством анализа активности каталазы и дегидрогеназы.

Влияние лектина молочнокислых бактерий на цитокиновую активность фагоцитов

Долмашкина А.С., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»; alina.dolmashkina@yandex.ru

В последние годы значительное внимание уделяется изучению функциональной роли лектинов бактерий в организме человека и животных. Наименее изученными в этом плане являются лектины молочнокислых бактерий.

В настоящей работе изучали влияние лектина *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, выделенного нами ранее [1], на цитокиновую активность фагоцитов.

Лектин (Л1) в объеме 0,2 мл (1,5 мг/мл) вводили внутрибрюшинно беспородным белым мышам. Перитонеальные (ПМФ) и альвеолярные (АМФ) и макрофаги выделяли по общепринятой методике из брюшной полости и легких на 1, 3, 5 и 7 сутки после введения лектина [2]. В качестве объекта фагоцитоза использовали суточную культуру

Staphylococcus aureus 209-P. Провоспалительные цитокины интерлейкин-1 α (ИЛ-1 α) и фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), продуцируемые макрофагами в процессе фагоцитоза, определяли с помощью иммуноферментных моноклональных тест-систем.

В процессе исследований было показано, что ПМФ и АМФ макрофаги, выделенные из организма мышей на первые и пятые сутки, активнее синтезировали ИЛ-1 α через 6 часов фагоцитоза *in vitro* по сравнению с контролем. На седьмые сутки после введения лектина, наблюдалось превышение содержания ИЛ-1 α в отношении только АМФ после 30 минут процесса фагоцитоза по сравнению с контролем. Лектин не оказывал существенного влияния на продукцию ФНО- α , за исключением 7-х суток эксперимента. Продукция цитокинов АМФ превышала контрольные значения через 30 минут и 1 час фагоцитоза. С целью подтверждения участия лектина в синтезе цитокинов фагоцитирующими макрофагами *in vitro* определяли изменение количества цитокинов, продуцируемых фагоцитирующими макрофагами под влиянием лектина, блокированного специфичными к нему углеводами и бычьего сывороточного альбумина (БСА) - в качестве контроля. Было показано, что синтез ИЛ-1 α и ФНО- α под влиянием БСА ПМФ в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-P существенно не отличался от результатов продукции цитокинов ПМФ, подвергшихся влиянию блокированного лектина *L. Delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. При этом АМФ под воздействием БСА, были более активны через 6 часов проведения эксперимента, по сравнению с результатами АМФ, подвергшихся влиянию блокированного лектина *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Одинаковое количество цитокинов (ИЛ-1 α и ФНО- α), синтезируемых контрольными ПМФ и ПМФ под действием блокированного лектина, явилось свидетельством специфического взаимодействия лектина *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с поверхностными структурами ПМФ. Увеличение количества ИЛ-1 α , продуцируемого АМФ под действием блокированного лектина, свидетельствовало о том, что на молекулярном уровне лектин *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, возможно, помимо специфического взаимодействия с рецепторными структурами АМФ может участвовать и в различных неспецифических реакциях.

Представленные результаты позволяют говорить о способности лектина *L. Delbrueckii* ssp. *bulgaricus* вызывать индукцию фагоцитами провоспалительных цитокинов, в большей степени ИЛ-1 α .

Литература

1. Долмашкина А.С., Балашова О.О., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Выделение агглютинирующих белков с поверхности молочнокислых бактерий // Актуальная биотехнология. – 2015, – № 3(14), С. – 31.
2. Кондратьева И.А., Воробьева И.В., Буракова О.В. Практикум по иммунологии: Учебное пособие под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова, М.: МГУ. – 2001. – С. – 224.

Генетические детерминанты и функциональные маркеры в геномах бактерий рода *Pseudomonas*, из ассоциаций с байкальскими гидробионтами

Клименко Е. С.^{1*}, Белькова Н. Л.^{2}**

¹Иркутский государственный университет

²Лимнологический институт Сибирское отделение РАН, г. Иркутск

*klimenko.elizabet@gmail.com; ** nlbelkova@gmail.com

Физиология животных тесно связана с метаболизмом ассоциативной микробиоты. Ассоциативный симбиоз представляет собой многокомпонентную интегральную систему, включающую хозяина в качестве макроорганизма и стабильный консорциум доминантных и ассоциированных микросимбионтов с разнонаправленными

воздействиями, определяющими формирование, стабильность существования и продуктивность симбиоза в целом [Бухарин и др., 2007]. Пути влияния микросимбионтов на жизнедеятельность многоклеточных хозяев варьируют от эффективного переваривания и поглощения питательных веществ до контроля патогенов с помощью эффективной и сбалансированной барьерной функции, а также путем запуска программ развития [Graf, 2016; Fraune et al., 2010]. Бактерии рода *Pseudomonas*, как убиквитарные микроорганизмы, часто присутствуют в ассоциациях с гидробионтами [Белькова и др., 2016].

Гены, детерминирующие особенности вторичного метаболизма, секреции, рестрикции/модификации, устойчивости к антибиотикам, патогенности и симбиогенеза, относятся к категории вспомогательных генов и обеспечивают приспособленность их носителей к условиям конкретной экологической ниши или способность к адаптивному ответу в определенном диапазоне изменяющихся условий среды [Шестаков, 2007].

Целью данного исследования стало изучение разнообразия генов патогенности и продукции антибиотиков у бактерий рода *Pseudomonas*, ассоциированными с разными байкальскими гидробионтами.

Материалы и методы

Объектами исследования были штаммы бактерий рода *Pseudomonas*, ассоциированные с байкальскими гидробионтами – эндемичными губками (*Lubomirskia baicalensis*), лещом (*Abramis brama*) и желтокрылкой (*Cottocomephorus grewingkii*) [Белькова и др., 2016, 2018]. Штаммы, использованные в работе, культивировали на питательных средах РПА/10, ПДС и R2A как было описано ранее. Выделение геномной ДНК проводили из суточных культур с использованием коммерческого набора AxuPrep Bacterial Genomic DNA kit (Axugene, США). Фрагменты целевых генов амплифицировали на специфичных праймерах: гены патогенности *ecfX*, *toxA*, *oprI*, *fliC*, *oprL*, *algD*, как было описано ранее [Белькова и др., 2018], а также гены продукции антибиотиков *Phl* (2,4-диацетилфлороглюцинол), *phzH* (феназин-1-карбоксамид), *PhzA* (феназин-1-карбоновая кислота), *Prn* (пирролнитрин), *Plt* (пиолотеорин), как было описано ранее [Raaijmakers et al., 1997; Delaney et al., 2001; Mavrodí et al., 2001]. Продукты амплификации анализировали в агарозном гель-электрофорезе, целевые ампликоны визуализировали на трансиллюминаторе.

Результаты и обсуждение

Все штаммы (33 шт.), использованные в работе, были разделены на группы, согласно макроорганизму, из ассоциации с которым они были выделены. Всего проанализировано 9, 14 и 10 штаммов, изолированных из губок (Г), леща (Л) и желтокрылки (Ж) соответственно. Различие данных ассоциаций заключается в том, что первая группа (Г) относится к микробиоте, ассоциированной с «внутренним» симбиозом, который может обеспечить утилизацию, деструкцию, метаболизм питательных веществ, а вторая (Л) и третья (Ж) группы относятся к микробиоте, ассоциированной с внешними покровами, основная функция которой должна быть связана с защитой от неблагоприятных факторов внешней среды.

В геномах группы штаммов, изолированных из губок, не выявлено генов продукции антибиотиков, а из генов патогенности присутствуют только *oprI* и *algD* (табл. 1). Радикально отличаются группы, ассоциированные с внешними покровами рыб. У группы штаммов, изолированных из леща, детектированы различные гены продукции антибиотиков, из генов патогенности присутствуют *ecfX* и *toxA*, так же отмечено много носителей гена *algD*. В группе штаммов, изолированных из желтокрылки, наблюдается большее разнообразие генов патогенности и всего два гена продукции антибиотиков – 2,4-диацетилфлороглюцинола (*Phl*) и пиолотеорина (*Plt*). В обеих группах имеются носители сразу нескольких генов продукции антибиотиков. Следует отметить наличие штаммов, обладающих набором как генов продукции антибиотиков, так и генов патогенности,

причем в группе Л их больше, чем в группе Ж. Данные штаммы выделены как из язв, так и из внешне здоровых участков покровов. В группе Ж такими характеристиками обладает лишь один штамм – Ж1Н-8.

Табл. 1. Представленность (%) генов продукции антибиотиков и генов патогенности в геномах штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, изолированных из губок (Г), леща (Л) и желтокрылки (Ж)

Группа	Антибиотики							Гены патогенности						
	<i>Phl</i>	<i>PhzH</i>	<i>PhzA CD</i>	<i>PhzA XY</i>	<i>Prn</i>	<i>Plt</i>	Нет генов	<i>ecfX</i>	<i>toxA</i>	<i>oprI</i>	<i>fliC</i>	<i>oprL</i>	<i>algD</i>	Нет генов
Г	–	–	–	–	–	–	100	–	–	11	–	–	11	78
Л	5	–	5	11	5	26	48	13	6	6	–	–	50	25
Ж	8	–	–	–	–	25	67	25	8	–	8	17	8	34

Детерминанты патогенности, кроме прекурсора экзотоксина А (*toxA*), подавляющего синтез белка в животных клетках, обеспечивают приспособляемость и выживаемость общества: образование биопленок, более гибкую регуляцию транскрипции, улучшенную адгезию и др. Данные гены выгодны бактериальному сообществу, формирующемуся на внешних покровах и выполняющему защитные функции для макроорганизма, и потому могут быстро распространяться между отдельными его представителями путем горизонтального переноса. Отсутствие этих функциональных маркеров в геномах штаммов, ассоциированных с губками, может свидетельствовать о другом воздействии микросимбионтов на макроорганизм, связанном, в первую очередь, с участием в метаболизме питательных веществ.

Эффективность симбиотических взаимоотношений между макроорганизмами и микросимбионтами определяется генетическими детерминантами, обеспечивающими положительный эффект на жизнедеятельность хозяина (эффективное поглощение питательных веществ, барьерная функция и др.)

Работа выполнена в рамках темы VI.50.1.4. «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений» (0345-2016-0002) и частично поддержана проектами РФФИ №16-04-00065 и 16-54-150007.

Литература

1. Ассоциативный симбиоз / О. В. Бухарин, Е. С. Лобакова, Н. В. Немцева, С. В. Черкасов. — Изд-во УрО РАН Екатеринбург, 2007. — С. 264.
2. Graf J. Lessons from Digestive-Tract Symbioses Between Bacteria and Invertebrates. // Annu. Rev. Microbiol. 2016. V. 70. P. 375–93. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104258
3. Fraune S., Bosch T.C. Why bacteria matter in animal development and evolution // Bioessays. 2010 V. 32. № 7. P. 571-80. doi: 10.1002/bies.200900192
4. Шестаков С В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. 2007. Т. 5. № 2. С. 12-24.
5. Белькова Н.Л., Деникина Н.Н., Суханова Е.В. и др. Гетерогенность популяций органотрофных микроорганизмов на внешних покровах больных рыб // Вода: Химия и Экология. 2016. № 4 (94). С. 32–39.
6. Белькова Н.Л., Деникина Н.Н., Клименко Е.С., Ханаев И.В., Дзюба Е.В. Детекция и генетическая характеристика бактерий рода *Pseudomonas* из микробных сообществ озера Байкал. // Генетика. 2018. Т. 54 (в печати)
7. Raaijmakers J.M., Weller D.M., Thomashow L.S. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 3. P. 881-887. PMID: PMC1389120
8. Delaney S.M., Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Thomashow L.S. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 1. P. 318-327. doi: 10.1128/JB.183.1.318-327.2001

9. Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M.J., Phillips G., Thomashow L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 21. P. 6454-6465. doi: 10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001

Образование биопленки молочнокислыми бактериями

Тяпкин А.Ю., Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И Вавилова»
ta844@ya.ru

Изучали способность молочнокислых бактерий образовывать биопленку. Объектом исследований являлись культура *Lactococcus lactis* В-1662, полученная из Российской коллекции микроорганизмов (Пушино-на-Оке) и *Streptococcus thermophilus*, полученная из сухого порошка лиофилизированной бактериальной закваски термофильного стрептококка (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г. Москва).

Оценку способности к формированию биопленки бактериями проводили по оптическому методу [3]. Было показано, что *L. lactis* В - 1662 и *S. thermophilus* способны образовывать биопленку, максимальное количество которой обнаруживалось при концентрации 10^{-1} кл/мл.

В процессе исследования были изучены различные факторы (температура, время, рН, ЭПС) влияющие на способность *L.lactis* В – 1662 и *S. thermophilus* образовывать биопленку. Установлено, что максимальное образование биопленки *L. lactis* В-1662 наблюдается при 48 ч культивирования и температуре 28 °С, а для *S. thermophilus* при 24 ч культивирования и температуре 38 °С. Полученные данные позволяют предположить участие ЭПС этих бактерий в образовании биопленки, поскольку нами ранее было обнаружено [1,2], что максимальное количество ЭПС у *L. lactis* В – 1662 приходится на 48 ч, а у *S. thermophilus* на 24 ч культивирования. Оптимальным значением рН для образования биопленки *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* являлось рН 6. Внесение экзополисахаридов, изучаемых молочнокислых бактерий, которые получали по методу [1,2], в качестве «затравки», также приводило к увеличению способности культур образовывать биопленку.

Литература

1. Урядова Г.Т., Тяпкин А.Ю., Фокина Н.А., Карпунина Л.В.. Выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: Мат. Всероссийской науч.-практ. конф. - Саратов: Издательский центр “Наука”, 2015. – С. 109-113.
2. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования// Аграрный научный журнал. 2016. – № 12. – С. 40-42.
3. O 'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. // Mol. Microbiol. – 1998. – V.28, №3. – P.449-461.

Биологическая активность экзополисахаридов молочнокислых бактерий

Урядова Г.Т. *, Фокина Н.А. *, Горельникова Е.А. *, Карпунина Л.В. *, Маслякова В.А. **,
Александрова С.С. **, Позднякова О.И. **

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»
eni_galina@mail.ru, fockina.nadejda@yandex.ru
ФГБУ «Саратовская МВЛ»**; sarmvl@mail.ru

В последние годы значительное внимание уделяется экзополисахаридам (ЭПС) бактерий, а среди них – ЭПС молочнокислых бактерий [1, 2]. Известно, что молочнокислые бактерии, являясь естественной микрофлорой животного организма, способны подавлять рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет продуцирования антибиотиков [3], молочной, уксусной, пропионовой кислот [4], ЭПС [5]. Имеются работы относительно влияния ЭПС молочнокислых бактерий на иммунную систему организма животных [6].

Исследования, проводимые нами, показали, что ЭПС *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* В-1662 способны проявлять в разной степени бактерицидное действие в отношении: *Escherichia coli* 113-13 и ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 209-Р, *Pseudomonas aeruginosa* AT-31 и ATCC 27853, *Xanthomonas campestris* 610 и 611. Кроме того, ЭПС *S.thermophilus* угнетал рост *Klebsiella pneumoniae* К2, а ЭПС *L.lactis* В-1662 – *B.subtilis* 262. Фунгицидная активность ЭПС *S.thermophilus* и *L.lactis* В-1662 в отношении *Candida albicans* 223 и 13108 не была выявлена. Обнаружено, что ЭПС *S.thermophilus* и *L.lactis* В-1662 индуцируют синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α и ФНО- α) иммунокомпетентными клетками при моделировании процесса фагоцитоза *S.aureus* 209-Р *in vitro*; влияют на фагоцитарную активность макрофагов, как альвеолярных, так и перитонеальных, при фагоцитозе бактерий *S.aureus* 209-Р. Исследование токсичности на биотест – объектах (инфузории, лабораторные животные) показало, что исследуемые ЭПС являются не токсичными.

Литература

1. Welman A. D., Maddox I. S., Archer R. H. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – V. 95. – P. 1200–1206.
2. Thapa D., Zhang H. *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide reduces mutagenic potential of genotoxins // International Journal of Probiotics and Prebiotics. – 2009. – V. 4, № 3. – P. 79–82.
3. Биттеева М.Б., Бирюков В.В., Щерблыкин И.Н., Шушеначева Е.В., Осипова В.Г., Минаева Л.П., Стехновская Л.Д., Коваленко Н.В., Милов М.С., Плессер Л.М., Макеев П.П., Барбот В.С. Штамм *Lactococcus lactis* ВКПМ-В-7699 продуцент бактерицина низина // Патент РФ №2151796. 2000.
4. Coconnier M.H., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. – V. 41, № 5. – P. 1046–1052.
5. Фомина И.В., Карпунина Л.В., Бухарова Е.Н., Полукаров Е.В. Влияние ЭПС бактерий на бактерицидные свойства молочнокислых комплексов // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008. – Приложение 2; 3(23). – С. 338–339.
6. Arai K.I., Lee F., Miyajima A., Miyatake S., Arai N., Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses // Annual. Rev. Biochem. – 1990. – 59. – P. 783-836.

Белки параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* – функциональные амилоиды

Юдина Т.Г.¹, Го Даньян², Чен Л.², Полянская А.Б.¹, Непрусов А.И.¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»
yudinatg@mail.ru

²Институт сельскохозяйственных наук и технологии Шаньдунской Академии
сельскохозяйственных наук, Цзинань, Китай.

В последние годы расширилось изучение белковых амилоидных фибрилл и амилоидоподобных структур (АФ). АФ встречаются среди структурных молекул, адгезинов, токсинов, и др. Накапливается всё больше сведений о множестве АФ, не сопряженных с патологией, а выполняющих полезные для образующих их клеток функции. Такие АФ выделили в группу функциональных амилоидов. Высказано предположение, что они существуют во всех доменах живого мира, выполняют важную роль в адаптации клеток к условиям окружающей среды [1, 2]. Наши предыдущие исследования параспоральных кристаллов энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ) выявили наличие АФ, что, в совокупности с результатами спектрофотометрического анализа, позволило впервые отнести к функциональным амилоидам белки кристаллов, δ -эндотоксины *B. thuringiensis* [3].

Цель настоящей работы - сравнительное изучение свойств АФ, образуемых различными δ -эндотоксинами *B. thuringiensis*, обоснование их внесения в группу функциональных амилоидов.

ТЭМ показала, что АФ δ -эндотоксинов разных подвидов *B. thuringiensis* имеют некоторые отличия, которые мы определили количественно (толщина, длина АФ). Среди изученных нами нескольких подвидов энтомопатогенной бактерии δ -эндотоксины *B. thuringiensis* subsp. *amagiensis* наиболее интенсивно образуют АФ. ЭФ в ПААГ показал, что кристаллы этого подвида состоят из уникальных 53 и 43 кДа-белков, а также из Сут белка, проявляющих высокую антибактериальную активность. При созревании АФ изменяются их диаметр и длина. Некоторые из АФ могут сливаться, образуя «ветвящиеся» АФ разной толщины. Мы наблюдали разные стадии образования АФ при формировании ими параспоральных кристаллов ряда подвидов *B. thuringiensis* (Рис.). При этом процесс упорядочения АФ у сравниваемых подвидов энтомопатогенной бактерии имеет различия.

Совокупность полученных и литературных данных даёт основание относить образуемые δ -эндотоксинами АФ к группе функциональных амилоидов, так как способность к образованию АФ и их свойства, несомненно, полезны для энтомопатогенной бактерии. Так, благодаря АФ кристаллы легче адсорбируются на разных поверхностях, соединяются между собой и со спорами, что необходимо для оптимального выполнения их биологических функций. Кроме того, известно, что АФ разных белков присуща цитотоксичность, они индуцируют агглютинацию бактерий – значит, кристаллы ещё до своего полного растворения в кишечнике чувствительных беспозвоночных начинают эффективно выполнять свою мембранотропную функцию, нарушая, во-первых, проницаемость цитоплазматических мембран клеток жертвы. Белки растворяющихся кристаллов и ряд фрагментов этих белков, находясь в различном структурном состоянии (в том числе – и в состоянии АФ), не только эффективно разрушают цитоплазматическую мембрану кишки чувствительных личинок, но и оказывают антимикробный эффект, приводящий к ослаблению и гибели конкурентной для *B. thuringiensis* микробиоты личинок. Эти белки связываются с клеточными стенками таких микроорганизмов кишечника, разрушая последние и нарушая проницаемость цитоплазматических мембран, что приводит к гибели микроорганизмов. Это обеспечивает

благоприятные условия для преимущественного развития энтомопатогенных бактерий в погибающей личинке.

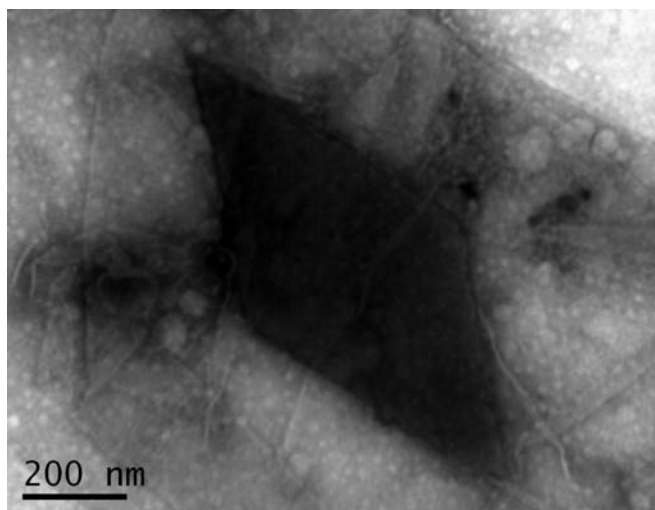
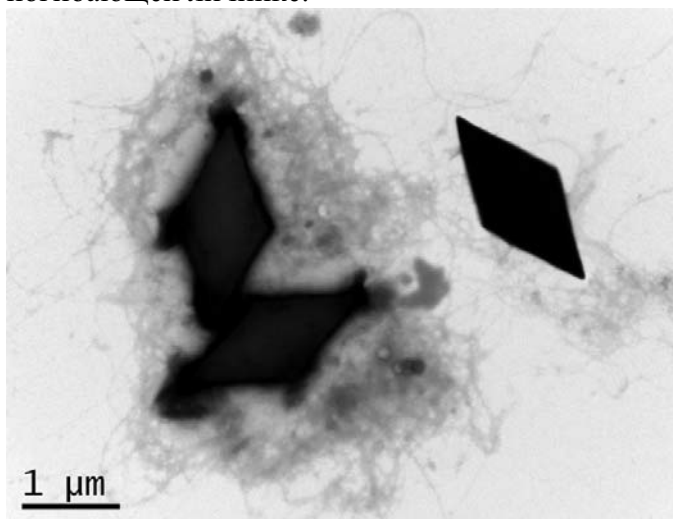


Рис. ТЭМ кристаллов *B.thuringiensis* и АФ. Контрастирование фосфовольфрамовой кислотой. На фото справа видны разные стадии структурированности АФ при формировании параспоровального кристалла. Ув. в 20 тыс. раз слева и в 250 тыс. - справа.

Литература

1. Довидченко Н.В., Леонова Е.И., Галзитская О.В. Механизмы образования амилоидных фибрилл. Успехи биологической химии. 2014. т. 54. 203–230.
2. Dragoš A., Kovács A.T., Claessen D. The Role of Functional Amyloids in Multicellular Growth and Development of Gram-Positive Bacteria. *Biomolecules* 2017. 7(3). 60; doi:10.3390/biom7030060.
3. Yudina T.G., Danyang Guo, Zalunin I.A., Netrusov A.I. δ -Endotoxins of *Bacillus thuringiensis* form amyloid fibrils there are involved in the formation of parasporal crystals. FEMS. 2015. Maastricht, the Netherlands. 1245.

Выделение и особенности структурно-функциональной организации радиоустойчивых бактерий

Абашина Т.Н.^{1,2}, Сузина Н.Е.¹, Шорохова А.П.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

²ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт»

Известно, что внешние воздействия различных физических факторов на бактерии могут изменять численность и активность клеток в популяции, индуцировать ферментативную активность, направленную на выживание в естественной среде активно растущих микроорганизмов (например, ферментов, обеспечивающих высокий уровень непрерывной репарации ДНК), или инициировать переход клеток бактерий в покоящееся состояние и т.п. Эти молекулярные регуляторные и структурно-функциональные изменения зависят от типа, мощности и продолжительности воздействия. Структурно-функциональные адаптационные механизмы устойчивости у микроорганизмов, обеспечивающие их выживание под воздействием различных внешних неблагоприятных факторов, являются объектом постоянного внимания исследователей (Radioresistance. A Search for Carotenoids in *Rubrobacter radiotolerans*. P. Betlem, P. Bovens, T. Dings, S. Vriend. 2012. Radboud University Nijmegen). Возрастающее давление физических техногенных факторов на окружающую среду увеличивает актуальность таких исследований. Весьма вероятным представляется, что в различных природных биотопах под воздействием различных поражающих факторов идет непрерывное формирование новых молекулярных, клеточных и надклеточных механизмов выживания у известных и хорошо изученных бактериальных организмов.

Нами были выделены три штамма *Pseudomonas*, бактериальные клетки которых окружены дополнительной экстрацеллюлярной оболочкой сложной структуры, которая может окружать группу клеток. Обнаружена способность этих коммунальных структур к росту и саморазмножению путём формирования перегородок. Репродукция вегетативных клеток происходит асинхронно по отношению к делению общеклеточной экстрацеллюлярной оболочке.

Общеклеточная оболочка имеет вид округлых шаровидных или овоидных структур диаметром от 4-5 до 20-50 мкм. Выявлено, что толщина стенок этой оболочке и толщина фибриллярно-везикулярного слоя на поверхности колоний возрастает с увеличением интенсивности УФ-облучения. Как правило, внутри общеклеточных экстрацеллюлярных оболочек, формирующихся в поверхностном слое колонии, вмещались только 2-4 клетки, тогда как в общеклеточных оболочках, образовавшихся в отсутствие УФ, насчитывалось до 20-30 клеток. Нередко клетки поверхностного, наиболее близкого к источнику УФ слоя, имели индивидуальные толстостенные камеры «скафандры». Показано, что в формировании стенки общеклеточной экстрацеллюлярной оболочке и внутрикамерных перегородок принимают участие везикулы наружной мембраны, отделяющиеся от поверхности клеток радиоустойчивых псевдомонад. Множественные везикулы, включаясь во внутрикамерный матрикс путем отшнуровывания с поверхности клеток, выстраиваются в цепочки вблизи внутренней поверхности стенки оболочке и, затем, сливаясь друг с другом, одновременно встраиваются в стенку общеклеточной оболочке или в область формирования перегородки. При этом толщина стенки оболочке увеличивается, а протяженность перегородки внутри оболочке постепенно увеличивается и замыкается с формированием непрерывной границы раздела внутри камеры. Обнаруженная нами «строительная» функция везикул наружных мембран, является коллективным поведением бактерий внутри общеклеточной экстрацеллюлярной оболочке является уникальным и описано впервые.

Молекулярно генетический анализ генов 16S рДНК показал, что все три штамма относятся к *Pseudomonas stutzeri*. Штаммы были сравнены между собой при помощи ERIC PCR с ERIC-праймерами. Все три штамма имеют различный REP PCR профиль, что говорит о неклональной идентичности.

Кроме того, были проведены дополнительные эксперименты по выявлению возможной роли общеклеточной экстрацеллюлярной оболочки в естественной среде обитания – созданию щита от лучей жесткого УФ. При совместном культивировании штамма *Pseudomonas sp.* EM42 и штамма *Kocuria rosea* VKM B-1236, который высокочувствителен к лучам жесткого УФ, было обнаружено, что *Kocuria rosea* формирует микроколонии внутри колонии *Pseudomonas sp.* EM42, вовлекается в общеклеточную экстрацеллюлярную оболочку, с сохранением целостности находящихся в них клеток, жизнеспособность которых подтверждается микробиологическими методами (пересевы), в то время как монокультура *Kocuria rosea* погибала под лучами жесткого УФ.

Все три штамма были исследованы на наличие плазмид. Была выделена плазмидная ДНК, полученные препараты исследовали при помощи гель-электрофореза, который показал наличие плазмид у штаммов *Pseudomonas spp.* EM42 и EM47 (IncP), *Pseudomonas sp.* EM46 (IncPa, IncPβ, IncQ), в то время как типовой штамм не имеет плазмид.

Были проведены дополнительные опыты по определению наличия генов устойчивости к жесткому ультрафиолету на плазмидной ДНК. Для этого были выполнены конъюгации штамма-носителя плазмидной ДНК *Pseudomonas sp.* EM46 со штаммами *Escherichia coli* XL-1blue и *Escherichia coli* IM109 (устойчивы к антибиотику налидиксин), *Pseudomonas putida* PAW340 (устойчив к антибиотику стрептомицин), а также с типовым штаммом *Pseudomonas stutzeri* VKM B-975^T. Разделение конъюгантов проводили, основываясь на резистентности штаммов к антибиотикам. Полученные конъюганты проверяли на устойчивость к УФ. Полученные конъюганты не приобретали способность расти в условиях жесткого ультрафиолета, поэтому нами был сделан вывод о том, что гены устойчивости к жесткому ультрафиолету находятся не на плазмидной ДНК.

Таким образом, обнаружен ранее неизвестный тип коммунальной экстрацеллюлярной структуры псевдомонад, исследована его организация и показана его защитная роль при неблагоприятных воздействиях. Вместе с этим изучены изменения, происходящие в указанной защитной структуре при стрессовых воздействиях УФ излучения на бактерии. Развитие клеток в делящихся камерах-мешочках является примером коллективного поведения бактериальных клеток, а также способностью приспосабливаться к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Образование фунгицидных пептидов штаммом *Paenibacillus peoriae* MBV-2

Абашина Т.Н., Лауринвичюс К.С., Вайнштейн М.Б.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; vain@ibpm.pushchino.ru

Широкая распространенность грибных инфекций представляет собой серьезную проблему для медицины и сельского хозяйства. В сельском хозяйстве подавление болезней растений, вызываемых мицелиальными грибами, длительное время было основано на применении химических фунгицидных препаратов, опасных загрязнением окружающей среды и сохранением токсичных соединений в собираемом урожае. Эта проблема привела к применению биологических агентов – антагонистов инфекционных мицелиальных грибов, продуцентов фунгицидных соединений. Было показано, что ряд бактерий способен образовывать антибиотики, обладающие антифунгальными свойствами. Такие антибиотики могут быть использованы в медицине, а в случае их применения в сельском хозяйстве процесс может быть удешевлен за счет прямого применения жидкой среды с биомассой или

биомассы. При прямом использовании биомассы удобной для практического применения группой бактерий являются спорообразующие бациллы родов *Bacillus* и *Paenibacillus* [1].

В последние десятилетия для подавления грибковых заболеваний были подобраны штаммы разных видов бацилл. Примерами могут служить *B. brevis* [2], *B. mojavensis* [3], *B. subtilis* [4] и *P. polymyxa* [5]. Вместе с этим остается актуальной разработка новых биопрепаратов на основе новых штаммов с антифунгицидными свойствами.

Нами были сделаны высевы бактерий с поверхности здоровой кожи человека на сусло-агар, куда дополнительно внесли плесневые грибы *Penicillium* sp. Для дальнейшего выделения и изучения были отобраны колонии, демонстрирующие образования антагонистических зон подавления плесневых грибов (Рис. 1). Из колоний выделили чистые культуры спорообразующих бацилл (Рис.2, масштабный отрезок – 3 мкм). Для проверки перспективности выделенных и отобранных штаммов была проведена проверка подавления ими роста патогенных грибов, полученных из больных растений салата (белая гниль; *Sclerotinia* sp.) и укропа (мучнистая роса; *Erysiphe* sp.). Проверка, выполненная на сусло-агаре как среде, обеспечивающей активный рост грибов, позволила отобрать штамм MBV-2 с выраженными фунгицидными свойствами.

Анализ масс-спектра показал наличие у штамма MBV-2 двух близких форм антибиотика (Рис. 3). Одна форма имеет молекулярную массу приблизительно от 897 до 898, а вторая форма имеет молекулярную массу от 883 до 884 Да. Анализ существующих баз данных показал, что этот антибиотик соответствует известному ранее, продуцируемому *P. polymyxa* [5], его противогрибковая активность связана с разветвленным циклическим пептидом, состоящим из восьми аминокислот. Наши опыты показали, что антибиотик водорастворим, легко выделяется бациллами в среду, которая, таким образом, может быть использована вместе с биомассой или без нее для практического применения. Высокие концентрации антибиотика содержатся в биомассе, откуда они могут быть экстрагированы, например, метанолом или уксусной кислотой.

Молекулярно-генетическая идентификация штамма MBV-2 по 16S рДНК показала, что он с 99%-ной достоверностью относится к виду *Paenibacillus peoriae*. Ранее исследователи проверяли антагонистическую активность штамма этого вида в отношении фитопатогенных грибов и бактерий, но нашли только бактерицидную активность, обусловленную продуктами с малой молекулярной массой [6] и активные протеазы и хиназы. Таким образом, настоящая публикация является первым сообщением о наличии конкретного фунгицидного агента у *P. peoriae*.

Произведен подбор эффективных условий культивирования штамма для максимального получения антимикотических метаболитов. Бактериальные агенты контроля относительно недороги для массового производства, потому что они выращиваются в ферментерах большого объема и не требуют значительной последующей обработки. Споровые бациллы является предпочтительным организмом для использования в качестве агента биологического контроля, поскольку образуемые споры чрезвычайно устойчивы к нагреванию, сушке, химической обработке, воздействию ультрафиолетового излучения. Это позволяет хранить сухие клетки препарата бацилл в течение длительного времени. Штамм *P. peoriae* MBV-2 представляется перспективным для использования в качестве агента биологического контроля грибковых заболеваний растений. Не исключена возможность применения штамма или образуемого им фунгицида в медицине или в качестве добавки к косметическим товарам для продления их срока хранения – обоснованием такого применения служит выделение штамма со здоровой кожи.

В целом результаты выполненных исследований позволили подобрать методические подходы к созданию эффективного способа получения антифунгальных веществ бациллиарного происхождения в качестве доступной модели биопрепарата. По результатам проведенных исследований штамм *P. peoriae* MBV-2 может быть рекомендован как продуцент действующего начала нового биопрепарата.

Литература

- [1] Govindasamy V., Senthilkumar M., Magheshwaran V., Kumar U., Bose P., Sharma V., Annapurna K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: "Plant Growth and Health Promoting Bacteria" Maheshwari D.K. (ed.). // Microbiology Monographs. 2010. V. 18. P. 333-364.
- [2] Haggag W.M., Abd-El-Kareem F., Abou-Hussein S.D. Bioprocessing of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus polymyxa*: a potential biocontrol agent of gray mould disease of strawberry fruits. // IJEIT. 2013. V. 3 (2). P. 509-518.
- [3] Дунайцев И.А., Лев И.О., Клыкова М.В., Жиглецова С.К., Антошина О.А., Коломбет Л.В. Эффективность использования штамма *Bacillus mojavensis* для повышения урожайности пшеницы. // Агрохимия. 2017. №4. С. 76–82.
- [4] Ефименко Т.А., Зенкова В.А., Маланичева И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенио Т.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С. Противогрибковая и антибактериальная активность штамма *Bacillus subtilis* 534 – основы пробиотического лекарственного препарата споробактерина. // Успехи медицинской микологии. 2016. Т. 16. С. 125-128.
- [5] Kharbanda P., Coleman R., Jensen S., Beatty P., Tewari J.P., Yang J. Biocontrol agent and fungicide for blackleg disease. // Patent CA 2238289C. Date of publication 06.08.2013.
- [6] von der Weid I., Alviano D.S., Santos A.L., Soares R.M., Alviano C.S., Seldin L. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. // Appl. Microbiol. 2003. V. 95 (5). P. 1143-1151.



Рис. 1

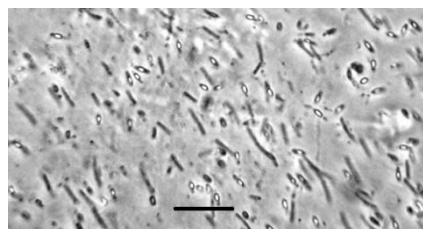


Рис. 2

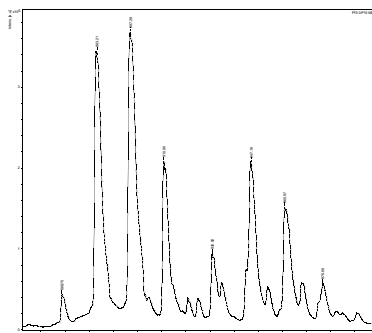


Рис. 3

Новые виды аэробных метилотрофных бактерий: *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov. и *Methylobacillus caricis* sp. nov.

Агафонова Н. В., Капаруллина Е. Н., Доронина Н. В., Троценко Ю. А.

ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино; nadyagafonova@gmail.com

Семейство *Methylophilaceae* относится к порядку *Methylophilales*, включает в себя три рода: *Methylophilus*, *Methylobacillus* и *Methylovorus*. В настоящее время род *Methylobacillus* представлен шестью видами аэробных, грамотрицательных облигатных и ограниченно факультативных метилотрофных бактерий: *M. glycogenes* ТК0113^T (Yorby, Weaver, 1977; Urakami, Komagata, 1986), *M. flagellatus* КТ^T (Говорухина с соавт., 1987), *M. pratensis* F31^T (Doronina et al., 2004), *M. arboreus* Iva^T, *M. gramineus* Lap^T (Gogleva et al.,

2011), *M. rhizosphaerae* Ca-68^T (Madhaiyan et al., 2013). На среде с метанолом в качестве единственного источника углерода и энергии нами выделены облигатно-метилотрофные штаммы Z (из активного ила очистных сооружений Байкальского целлюлозно-бумажного комбината, Иркутская область) и OV (из корней осоки *Carex* sp., отобранных в окрестностях г. Пушино, Московская область).

Цель работы – физиолого-биохимическая и таксономическая характеристика новых аэробных метилотрофных изолятов – штаммов Z и OV.

Новые изоляты представлены граммотрицательными неспорообразующими подвижными палочками, размножаются бинарным делением. Штамм Z оптимально растет при температуре 29-35°C и pH 6.5-7.5, рост ингибируется 1% NaCl; для штамма OV оптимальная температура – 22-29°C, pH 7.5-8.5, рост ингибируется присутствием 3.5% NaCl в среде. При росте на среде с метанолом в жирнокислотном составе клеток штаммов Z и OV преобладают гексадекановая C_{16:0} (44.5 и 45.5%, соответственно) и цис-9-гексадеценонная C_{16:1ω7c} (44.2 и 40.7%, соответственно) кислоты, основной убихинон Q₈. Доминирующие фосфолипиды – фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин и дифосфатидилглицерин. Энзимологический анализ показал, что оба штамма окисляют метанол классической метанолдегидрогеназой и реализуют рибулозомонофосфатный путь (РМФ) C₁-метаболизма, о чем свидетельствуют активности ключевого фермента гексулозофосфатсинтазы, а также дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата. Штаммы реализуют КДФГА-вариант РМФ-пути C₁-метаболизма, т.к. обнаружена активность 2-кето-3 дезокси-6-фосфоглюконатальдозазы.

Исследуемые штаммы имели высокий уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с таковыми у представителей рода *Methylobacillus*: штамм Z – 98,9% с *M. flagellatus* КТ^T, штамм OV – 99,6% с *M. gramineus* Lap^T и 98,7% с *M. glycogenes* ТК0113^T. Однако согласно ДНК-ДНК гибридизации, уровень гомологии между штаммом Z и *M. flagellatus* КТ^T составил всего 24%, между штаммом OV и *M. gramineus* Lap^T – лишь 52%, что свидетельствует о принадлежности штаммов к разным видам. Содержание Г+Ц в ДНК у штаммов Z и OV составило 51.0 и 51.4 мол. % (T_{пл}), соответственно. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка MxaF показал, что штаммы Z и OV имеют наибольшее сходство с *Methylobacillus glycogenes* ТК0113^T (99.1 % и 100%, соответственно).

Для определения генотипических различий между штаммом OV и *M. gramineus* Lap^T и *M. glycogenes* ТК 0113^T использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ). Результаты RAPD-анализа показали, что штаммы OV, Lap^T и ТК 0113^T имеют различные паттерны продуктов амплификации, что подтверждает их принадлежность к разным видам.

Таким образом, на основании исследования фено- и генотипических признаков штаммы Z и OV отнесены к новым видам рода *Methylobacillus* – *Methylobacillus methanolivorans* sp. nov. и '*Methylobacillus caricis*' sp. nov., соответственно.

Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма Z^T депонированы в GenBank под номерами KX057479 и KX256483, соответственно. Последовательности генов 16S рРНК и *mxaF* штамма OV депонированы в GenBank под номерами KY806199 и KY807769, соответственно. Типовые штаммы представлены в международных коллекциях микроорганизмов *Methylobacillus methanolivorans* Z^T (= VKM В-3037^T = JCM 31401^T = CCUG 68999^T) и '*Methylobacillus caricis*' OV (= VKM В-3158 = JCM 32031 = CCUG 70601).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00381_a.

Неорганические полифосфаты у метилотрофных дрожжей

Андреева Н.А., Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Кулаковская Т.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино; alla@ibpm.pushchino.ru

Рост дрожжей *Hansenula polymorpha* (*Ogatae polymorpha*) и *Pichia pastoris* (*Komagatella phaffii*) в среде, содержащей метанол в качестве источника углерода, стимулировался при увеличении концентрации фосфата до 10 мМ. В клетках, выращенных в среде с метанолом до стационарной стадии роста, содержание длинноцепочечных полифосфатов было сниженным по сравнению с клетками, выращенными в среде с глюкозой, а содержание короткоцепочечных полифосфатов увеличилось.

Табл. Содержание полифосфатов (полиР) в клетках метилотрофных дрожжей на стационарной стадии роста (мкмоль Р/ г сухой биомассы)

Фракция	Среднее число фосфатных остатков(длина цепи)	<i>Pichia pastoris</i>		<i>Hansenula polymorpha</i>	
		Глюкоза	Метанол	Глюкоза	Метанол
Кислоторастворимые полиР	15	192±8.6	202±13	78.1 ± 7.5	255 ± 15.8
Щелочерастворимые полиР	75	250±29	76±3.3	137.5 ± 8.1	53.6 ± 7.0
Кислотонерастворимые полиР	>200	90±4.6	20±1.0	25.0 ± 10.1	9.59 ± 5.4

Клетки, выращенные в среде с метанолом, в меньшей степени окрашивались ДАПИ и содержали меньше полифосфатных гранул в вакуолях. В клетках *H. polymorpha*, выращенных в среде с метанолом, наблюдали более высокую экзо – и эндополифосфатазную активность в мембранной фракции.

1 2 3



Эндополифосфатазная активность в мембранной фракции, полученной из клеток *H. polymorpha*, определена с помощью электрофореза в ПААГ. Инкубационная смесь (рН 7.2) содержала полифосфаты со средней длиной цепи 208 фосфатных остатков, 2,5 мМ MgSO₄ и 200 мМ NH₄Cl

- 1 – полифосфаты без препарата, контроль
- 2 – добавлен препарат мембранной фракции, полученной из клеток, выращенных в среде с глюкозой
- 3 – добавлен препарат мембранной фракции, полученной из клеток, выращенных в среде с метанолом

Клетки, выращенные в среде с метанолом, содержали вдвое меньше АТФ, чем клетки, выращенные в среде с глюкозой. Предполагается, что неорганические полифосфаты используются при росте в среде с метанолом в качестве дополнительного источника энергии.

Новый пиридиновый алкалоид гриба *Aspergillus cavernicola*

Антипова Т.В.^{а*}, Зайцев К.В.^{б*}, Жеребкер А.Я.^{б,в}, Тафеенко В.А.^б, Баскунов Б.П.^а,
Желифонова В.П.^а, Иванушкина Н.Е.^а, Николаев Е.Н.^{б,з}, Козловский А.Г.^а

^а ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, tantipova@ibpm.pushchino.ru

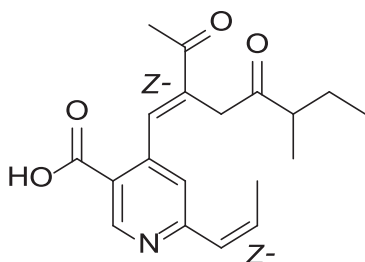
^б Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
zaitsev@org.chem.msu.ru

^в Институт энергетических проблем химической физики РАН, г. Москва

^з Сколковский институт науки и технологий, Сколково

Грибы рода *Aspergillus* синтезируют большое разнообразие вторичных метаболитов. Хемотаксономическое изучение аспергиллов показало, что у многих видов встречаются новые, ещё до конца не охарактеризованные метаболиты, изучение которых в будущем может привести к открытию новых биологически активных соединений.

В этой работе мы представляем данные по установлению структуры выделенного и очищенного нового вторичного метаболита гриба *A. cavernicola* ВКМ F-906 [1]. Штамм выращивали глубинно на минеральной среде. Метаболит выделяли экстракцией хлороформом из культуральной жидкости. Соединение очищали методом колоночной хроматографией и кристаллизацией. Структура метаболита была установлена с помощью масс-спектрометрии, одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. Химические свойства метаболита были исследованы методом Н/D обмена в источнике ионизации в отрицательном и положительном режимах электрораспыления. На основании полученных данных структура соединения была определена как 4-[(1E)-2-ацетил-5-метил-4-оксогепт-1-ен-1-ил]-6-[(1Z)-проп-1-ен-1-ил]пиридин-3-карбоновая кислота (рис.). Молекулярная структура метаболита, описанная в настоящей работе, является первым примером пиридиновых метаболитов, исследованных методом монокристаллического рентгеновского анализа



Структура метаболита имеет сходство с пиридиновыми алкалоидами монасникатинатами А-Д, содержащими эфирную связь. Возможно, что выделенное нами соединение является предшественником этих алкалоидов, поэтому оно получило тривиальное название «монасникатиновая кислота». В последнее время появляются данные об использовании в полифазной таксономии грибов профилей вторичных метаболитов. Так как монасникотиновая кислота была выделена из типового штамма гриба, то данный метаболит можно рассматривать как хемотаксономический маркер вида *A. cavernicola*. Следует отметить, что монасникатинаты и монасникатиновая кислота синтезируются у филогенетически отдаленных таксонов грибного царства - род *Monascus* и род *Aspergillus* соответственно. Известно, что вторичные метаболиты, могут быть уникальны для одного вида или секции, но также могут быть обнаружены у грибов из различных таксонов. Широкое распространение этих метаболитов объясняют горизонтальным переносом кластеров генов, кодирующих определенный биосинтетический путь вторичного метаболизма. Считается, что это происходит в результате совместного пребывания грибов в одной и той же экосистеме и находящихся в конкурентных отношениях.

Известно, что монасникатинаты являются биологически активными молекулами. Эти соединения действуют на PPAR γ (рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом) и могут использоваться для профилактики и/или лечения некоторых заболеваний, например, болезней, связанных с резистентностью к инсулину (метаболический синдром) [2]. Пиридиновые алкалоиды - редко встречающаяся у грибов группа вторичных метаболитов. Эти соединения привлекают внимание исследователей благодаря их сходству с растительными пиридиновыми алкалоидами, которые применяются как лекарственные препараты (анабазин, лобелин и др.). На основе этих данных можно предположить, что монасникатиновая кислота также обладает антидиабетической активностью и перспективна для дальнейших исследований.

Исследование масс-спектрометрии высокого разрешения финансировалось Российским научным фондом, грант №. 14-24-00114.

Литература:

1. T.V. Antipova, K.V. Zaitsev, A.Ya. Zherebker, V.A. Tafeenko, B.P. Baskunov, V.P. Zhelifonova, N.E. Ivanushkina, A.S. Kononikhin, E.N. Nikolaev, A.G. Kozlovsky. *Mendeleev Commun.*, 2018, 28 (in press).
2. M.-D. Wu, M.-J. Cheng, S.-J. Lin, C.-H. Chen, Y.-L. Chen, H.-P. Chen, K.-P. Chen, P.-S. Yang, S.-W. Chen and G.-F. Yuan, Patent US 20110165186 A1, 2011.

Локализация редуктазных активностей у анаэробов-носителей метакрилатной редокс системы

*Архипова О.В. *, Бирюкова Е.Н. *, Хохлова Г.В. *, Абашина Т.Н. *,
Ашин В.В. *, Микулинская Г.В. ***

* ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пущино, aroksan@gmail.com

** ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино

Уникальная метакрилатная редокс система *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*) (Галушко и др., 1996; Arkhipova et al., 2015; Mikoulinskaia et al., 1999) имеет периплазматическую локализацию и состоит из двух хромопротеидов: флавинодержущей метакрилатредуктазы Mrd (50 кДа) и её физиологического донора электронов – цитохрома *c* Mcc (30 кДа). Система Mrd+Mcc катализирует трансформацию метакрилата (ненасыщенного синтетического токсичного соединения, присутствующего в отходах метакрилатных производств) в изобутират (Галушко и др., 1994), при этом метакрилат служит терминальным акцептором восстановительных эквивалентов дыхательной цепи *G. sulfurreducens*.

Наиближайшие гомологи компонентов метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens*, чьи гены также организованы в единые транскрипты, были обнаружены нами ранее в геномах *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 (класс *Deltaproteobacteria*) и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809 (класс *Deferribacteres*) (Arkhipova et al., 2015). К началу наших исследований не существовало экспериментальных подтверждений наличия метакрилатного типа дыхания у бактерий каких-либо таксонов. Присутствие в геномах *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* гомологов белков метакрилатной редокс системы позволяет предполагать у этих организмов метакрилат- и акрилатредуктазную активности. Все упомянутые бактерии – ацетатооксиляющие анаэробы и представляют интерес для биоремедиации отходов бытового и промышленного происхождения.

Цель нашей работы - исследование активностей терминальных дыхательных редуктаз у анаэробных бактерий - обладателей генов-гомологов компонентов метакрилатной редокс системы, включая обнаружение и определение внутриклеточной

локализации активностей терминальных дыхательных редуказ, восстанавливающих метакрилат, акрилат, фумарат и нитрат у *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*.

Активности терминальных редуказ электрон-транспортных цепей у анаэробных бактерий *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* – а именно метакрилатредуктазы, акрилатредуктазы, фумаратредуктазы и нитратредуктазы – были измерены в суспензиях целых клеток (рис. 1). Все ферментативные активности определяли в двух вариантах: в присутствии пермеабиллизующего внутренние мембраны детергента ЦТАБ (бромид цетилтриметиламмония) и без него. Для клеток *A. dehalogenans* были показаны процессы восстановления фумарата и метакрилата, при этом добавление ЦТАБ снижало скорость восстановления этих субстратов. Клетки *D. acetiphilus* были способны восстанавливать нитрат, фумарат и метакрилат, причем добавление ЦТАБ снижало активность восстановления нитрата и метакрилата, но сильно увеличивало активность восстановления фумарата.

Исследование внутриклеточной локализации процессов восстановления фумарата и метакрилата у *A. dehalogenans* с помощью разделения периплазматической и внутриклеточной фракций подтвердило наличие метакрилат- и фумаратвосстанавливающих активностей в периплазме. Кроме того, электрофоретически в периплазме были обнаружены среди прочих две белковых полосы, молекулярная масса которых, рассчитанная по логарифму подвижности, составила 47 кДа и 28 кДа (рис. 2). Эти значения близки ожидаемым для зрелых гомологов Mrd и Mcc из *A. dehalogenans* 2CP-1 (Arkhipova et al., 2015).

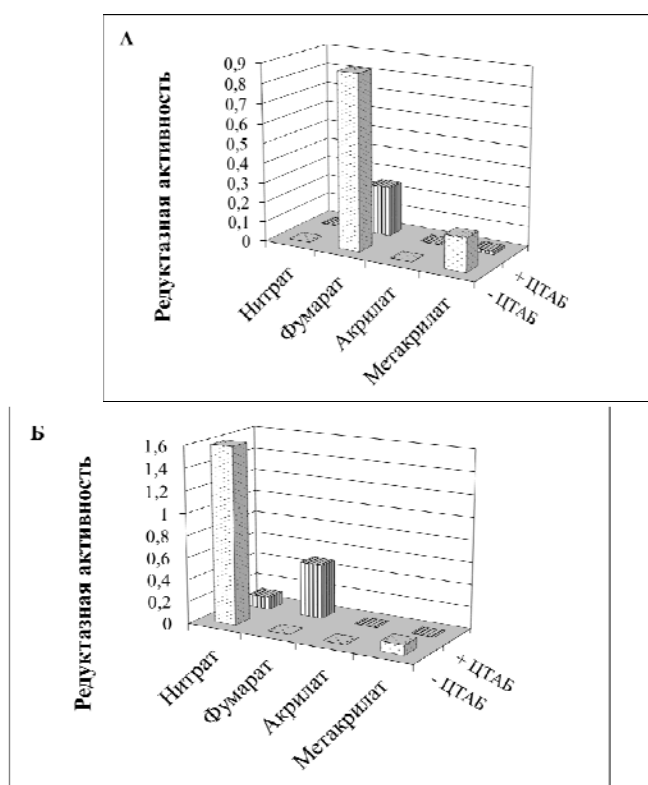
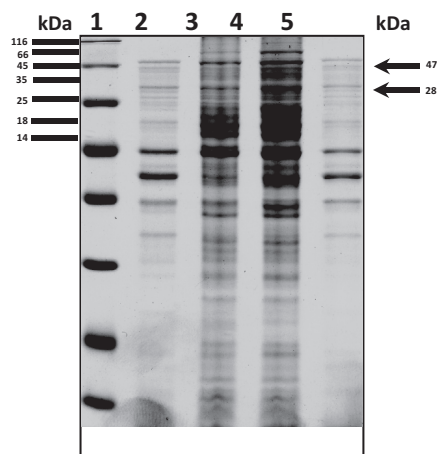


Рис. 1. Редуктазные активности *Anaeromyxobacter dehalogenans* (А) и *Denitrovibrio acetiphilus* (Б), mM·мин⁻¹·на 1 мг белка.

Рис. 2. Электрофореграмма белков клеточных фракций *Anaeromyxobacter dehalogenans*: 1- маркеры молекулярной массы, 2, 5 – периплазма, 3 – цитоплазма, 4 – целые клетки.



Эксперименты по выявлению редуктазных активностей *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* позволяют предполагать у этих бактерий наличие способности восстанавливать метакрилат, причём локализован этот процесс в периплазме. Оба организма способны восстанавливать также фумарат: у *A. dehalogenans* фумаратредуктазный процесс - периплазматический, у *D. acetiphilus* - внутриклеточный. Кроме того, *D. acetiphilus* имеет периплазматическую нитратредуктазную активность. Акрилатредуктазная активность у *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* используемыми методами обнаружена не была.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что анаэробные бактерии-носители генов-гомологов компонентов метакрилатной редокс системы обладают периплазматической метакрилатвосстанавливающей активностью. Метакрилатредуктазная активность у *A. dehalogenans* не является неспецифической активностью внутриклеточной фумаратредуктазы. Гипотеза о происхождении метакрилатной редокс системы от редуктазного комплекса, использующего в качестве субстрата токсичное природное соединение акрилат (Arkhipova et al., 2015), результатами пока не подтверждается.

Литература

1. Галушко А.С., Микулинская (Архипова) О.В., Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 495–498.
2. Галушко А.С., Образцова А.Я., Штаркман Н.Б., Лауринавичюс К.С., Акименко В.К. ДАН. Серия биологическая. 1994. Т. 335. С. 382–384.
3. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888.
4. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01068-а «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат».

Выделение и свойства L-лактатоксидазы дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКМ У-2378

Бирюкова Е.Н., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
г. Пущино, aarin@rambler.ru

L-лактатоксидаза (КФ 1.1.3.15) - флавиновый фермент, катализирующий окисление L-лактата до пирувата с восстановлением кислорода до перекиси водорода.

Лактатоксидаза широко применяется в медицине, пищевой промышленности, виноделии. В медицинской практике фермент используется для определения содержания L-лактата в крови и других физиологических жидкостях человека при различных патологических состояниях. Содержание лактата является также важным показателем при производстве вина, молочных и мясных продуктов. На основе лактатоксидазы созданы биосенсоры, используемые в медицине, виноделии и производстве продуктов питания.

L-лактатоксидаза обнаружена у бактерий *Aerococcus viridans* [1], *Mycobacterium phlei* [2], *Pediococcus* sp. [3], *Lactococcus lactis* [4], *Mycobacterium smegmatis* [5], гриба *Geotrichum candidum* [6] и дрожжей *Yarrowia lipolytica* [7].

В зависимости от микроорганизма L-лактатоксидазы могут отличаться по своим свойствам: строению, молекулярной массе, активности, субстратной специфичности, оптимумам pH и др.)

Цель работы - выделение и изучение некоторых свойств L-лактатоксидазы из *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378.

В работе использовали дрожжи *Y. lipolytica* ВКМ Y-2378, полученные из ВКМ (ИБФМ РАН). Штамм-продуцент был отобран в результате скрининга штаммов *Y. lipolytica*. Для получения фермента дрожжи выращивали в биореакторах усовершенствованной конструкции на основе АНКУМ-2М. Для очистки фермента были использованы методы гидрофобной и ионообменной хроматографии [7]. L-лактатоксидаза была очищена в 251 раз до гомогенного состояния с выходом 45%. Удельная активность составляла 55.3 Е/мг белка (при 22 °С и pH 8.0).

Гомогенность очищенной L-лактатоксидазы подтверждали методом гельфильтрации, молекулярная масса была определена как 200-230 кДа (рис. 1). Денатурирующий электрофорез в ПААГе показал наличие одной полосы в области 50-56 кДа (рис. 2), что указывает на то, что фермент является тетрамером.

Известно, что лактатоксидазы из разных микроорганизмов могут различаться по молекулярной массе и содержать разное число субъединиц. Так, из бактерий *Aerococcus viridans* [1] и *Lactococcus lactis* [4] были выделены тетрамерные ферменты с массами субъединиц, равными 44 и 40 кДа, и соответственно молекулярными массами - 187 и 160 кДа. Ферменты, выделенные из бактерий *Mycobacterium smegmatis* [5] и грибов *Geotrichum candidum* [6], содержали по восемь субъединиц с примерно такими же массами: 45 и 50 кДа (мол. массы составляли 350 кДа и 400 кДа). В качестве простетической группы все указанные ферменты содержат ФМН.

Оптимальное значение pH для действия фермента определено как 7.0 - 8.5, что примерно соответствует pH-оптимумам для ферментов, выделенных из других микроорганизмов [1-6].

Выделенная нами L-лактатоксидаза проявляла строгую специфичность к L-лактату и не окисляла фумарат, пируват, сукцинат, аскорбат, дигидроксиацетон, гликолат, D-лактат, D,L-2-гидроксипируват, а также D, L-аланин или D-серин. Показанная узкая субстратная специфичность фермента сопоставима с таковой, определенной ранее для грибов *G. candidum* [6] и бактерий *A. viridans*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *Pediococcus* sp., *L. lactis* [1-5]. Следует добавить, что узкая субстратная специфичность делает возможным практическое применение фермента в биотехнологии для создания биосенсоров, а также для разделения рацемических смесей.

Наличие нескольких субъединиц фермента предполагает аллостерические эффекты, которые затрудняют кинетический анализ. Мы определили значение $S_{0.5}$, равное 0.37 мМ. Эта величина отражает более высокое сродство L-лактата к ферменту, чем показанное ранее у оксидаз с октамерной структурой: K_m для L-лактатоксидазы из *G. candidum* составляла 4.3 мМ [6], для *M. smegmatis* - 25 мМ [5].

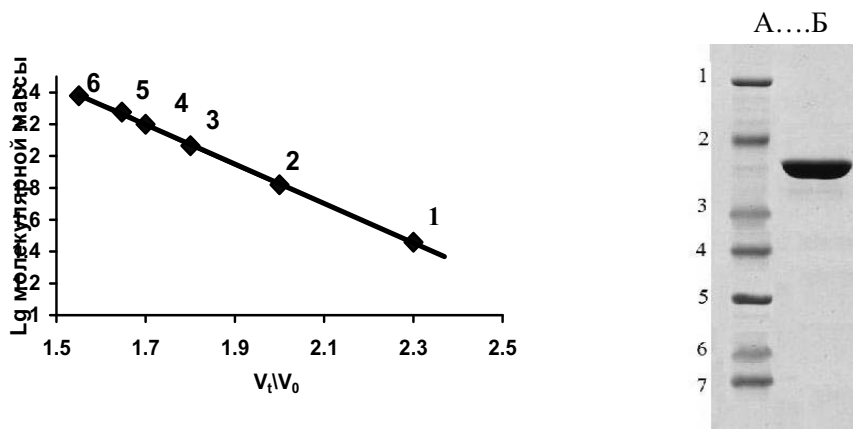


Рис. 1. Определение молекулярной массы препарата L-лактатоксидазы гельфильтрацией. Колонка (1.2 x 100 см) ТоyoPearl HW 55, трис-НСI буфер (25 мМ, рН 7.5). Скорость протока 1 мл/мин. Калибровочная кривая была получена с использованием стандартных белков: 1- карбоангидразы (29 кДа), 2-бычьего сывороточного альбумина (66.2 кДа), 3-β галактозидазы (116 кДа), 4-β-амилазы 200 (кДа), 5-лактатоксидазы, 6-апоферитина (443 кДа).

Рис. 2. Денатурирующий электрофорез L-лактатоксидазы в ПААГе. А - белки-маркеры: 1 - β-галактозидаза *E. coli* (116 кДа), 2 - бычий сывороточный альбумин (66.2 кДа), 3 - овалбумин куриного яичного белка (45 кДа), 4 - лактатдегидрогеназа (35 кДа), 5 - РНКазы *Bsp* 981 (25 кДа), 6 - β-лактоглобулин коровьего молока (18.4 кДа), 7 - лизоцим яичного белка (14.4 кДа). Б - L-лактатоксидаза из *Y. lipolytica*.

Таким образом, L-лактатоксидаза была выделена и очищена в 251 раз до гомогенного состояния; молекулярная масса, определенная с методом гельфильтрации, составила 200-230 кДа. С помощью денатурирующего электрофореза показано, что фермент является тетрамером с молекулярной массой субъединиц, равной 50-56 кДа. Показана высокая удельная активность (55.3 Е/мг белка) и узкая субстратная специфичность фермента.

Литература

1. *Duncan J.D., Wallis J.O., Azari M.R.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. V. 164. № 2. P. 919-926.
2. *Takemori S., Nakazawa K., Nakai Y., Suzuki K., Katagiri M.A.* // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 2. P. 313-319.
3. *Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E.* // J. Dairy Sci. 1989. V. 72. P. 859-863.
4. *Atsusi T., Yoshiaki N.* // J. Ferment. Bioeng. 1998. V. 85. № 5. P. 507-510.
5. *Sullivan P.A., Soon C.Y., Schreurs W.J., Cutfield J.F. and Shepherd M.G.* // Biochem. J. 1977. V. 165. № 2. P. 375-383.
6. *Куплетская М.Б., Сухачева М.В., Кураков А.В., Нетрусов А.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 199-202.
7. *Бирюкова Е. Н., Аринбасарова А. Ю., Мединцев А. Г.* // Прикладная биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 2. С. 217-221.

Разложение компонентов нефти почвенными бактериями

Борзова О.В.^{а,б}, Фунтикова Т.В.^а, Егозарьян Н.С.^б, Полищцева В.Н.^а,
Пунтус И.Ф.^а, Сузина Н.Е.^а, Головлёва Л.А.^{а,б}, Соляникова И.П.^а

^а ФГБУН ИБФМ им. Г.К.Скрябина, Пушкино Московской обл., пр-т Науки, 5

^б ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
oksana.borzova@inbox.ru

^в ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Загрязнение окружающей среды продуктами нефтепереработки, наряду с тяжелыми металлами, является одной из основных проблем современности. Сырая нефть представлена большим набором органических соединений различной природы (алифатические, алициклические, ароматические углеводороды и гетероциклические соединения), соотношение которых варьирует в зависимости от источника нефти. Углеводородная часть нефти состоит из алканов (парафинов), нафтенов (циклопарафинов) и аренов (ароматических углеводородов). Загрязнение компонентами нефти отрицательно сказывается на почвенных биологических системах, приводя к значительному снижению плодородия. Известно несколько приемов борьбы с нефтяными загрязнениями – механические, подразумевающие сбор и сжигание загрязненных почв, биостимуляция (внесение минеральных или органических добавок для активации собственной микрофлоры) и биоаугментация (внесение активных микроорганизмов, способных разлагать компоненты нефти). В природе естественные процессы восстановления почв от нефтяных загрязнений длятся от 10 до 50 лет. Применение современных биотехнологических процессов сокращает этот срок до 1-3 лет. Использование не чистых культур микроорганизмов, а их смесей положительно сказывается на эффективности процесса нефтеразложения.

Способность разлагать компоненты нефти присуща микроорганизмам различных таксономических групп, среди которых микромицеты, дрожжи и бактерии. Описано более 20 родов бактерий и около 10 родов грибов, проявляющих деструктивную по отношению к компонентам нефти активность. Важная роль в снижении уровня нефтезагрязнений принадлежит бактериям родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Tanase et al. 2013; Oberoi et al. 2015; Liu et al. 2016).

Целью настоящей работы было дать оценку вклада бактерий–представителей почвенной микрофлоры с различной деградативной способностью в процесс биоремедиации почв. Объектами исследования были бактерии, условно отнесенные к четырем группам в зависимости от их деградативного потенциала: 1) бактерии, выделенные из почв, загрязненных нефтью (7 штаммов бактерий рода *Rhodococcus*); 2) бактерии-деструкторы различных ароматических соединений (*Rhodococcus opacus* 1СР, *Rhodococcus wratislaviensis* G10, *Gordonia polyisoprenivorans* 135); 3) бактерии, выделенные из загрязненных образцов, но не обладающие высокими деградативными характеристиками (*Microbacterium foliorum* BN52); 4) типичные представители почвенной микрофлоры (*Arthrobacter agilis* Lush 13).

Модельные штаммы бактерий исследовали на способность к росту в неблагоприятных условиях (пониженные или повышенные температуры, экстремальные значения pH, условия засоленности); к разложению сырой нефти или ее отдельных компонентов (нонан, декан, гексадекан, бензол, толуол); к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании на дизельном топливе. В качестве образца была использована нефть из района Ашисай (Казахстан), содержащая алканы (78%), нафтены (6.7%), арены (3.7%) и другие компоненты (11.6%). Остаточное содержание нефти определяли методом инфракрасной спектроскопии по содержанию C-C, C-H связей на приборе AN-2 (Санкт-Петербург, Россия).

Степень деструкции сырой нефти у исследованных штаммов варьировала от 8 до 58%. Помимо сырой нефти, штаммы родококков F2-1, T3, K1 разлагали бензол, K2 - нафталин. Штамм *R. wratislaviensis* G10 разлагал фенол, нафталин, однако практически не проявлял активности с нефтью и дизельным топливом. Деструктор 3-хлорбензоата, штамм *G. polyisoprenivorans* 135 хорошо рос как на нефти, так и на дизельном топливе. Помимо способности разлагать нефтепродукты, бактерии рода *Rhodococcus* проявляли значительную устойчивость к воздействию факторов, тормозящих бактериальный рост: пониженная температура, повышенное содержание соли, экстремальные значения pH ростовой среды. Штаммы бактерий *Rhodococcus* spp. F2-1, F2-2, T3, B1, T3-4, K1, K2 росли в диапазоне значений pH среды 4-8 и температуре 4-37°C. Только четыре штамма (F2-2, F2-1, T3, T3-4) росли при pH 9. Ни один из них не рос при 9%-ном содержании NaCl.

Рост культур на дизельном топливе сопровождался синтезом ПАВ. По сравнению с контролем (поверхностное натяжение минеральной среды равно 77 мН/м), под действием ПАВ, выделяемых штаммами *Rhodococcus* sp. F2-2, *R. opacus* 1CP, *Rhodococcus* sp. F2-1 поверхностное натяжение снижалось до значений 36 ± 5 , 37 ± 1 , 40 ± 1 , соответственно. Под действием остальных культур снижение поверхностного натяжения имело менее выраженный характер. Штамм *R. wratislaviensis* G10 не продуцировал ПАВ, хотя количество колониеобразующих единиц при росте на дизельном топливе увеличивалось на 4 порядка, и данный штамм проявлял деструктирующую активность, хотя и незначительную, по отношению к сырой нефти.

Проведенные сравнительные микроскопические исследования (фазово-контрастная микроскопия) позволили выявить следующие закономерности: в условиях роста на легкой фракции нефти происходило существенное измельчение клеток родококков с тенденцией к формированию конгломератов; культивирование на алканах характеризовалось ростом популяции клеток в виде длинных, крупных, ветвящихся форм, характерных для роста родококков на богатых питательных средах.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наибольший вклад в снижение степени загрязнения окружающей среды от нефти и ее отдельных компонентов вносят бактерии, выделенные непосредственно из эпитопов, загрязненных нефтепродуктами, что является вполне ожидаемым. Не менее полезными и эффективными компонентами биопрепаратов при биоаугментации могут оказаться штаммы-деструкторы поллютантов, не являющиеся целевыми по отношению к нефти, но обладающие достаточным деградативным потенциалом. Тем не менее, нельзя недооценивать вклад, вносимый в очистку биотопов типичными представителями почвенной микрофлоры, которые не обладают ярко выраженной деструктивной активностью по отношению ко множеству поллютантов, но способны разлагать некоторые из них.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 14-14-00368) и Казахстанско-российского проекта № 142 «Разработка концепции мониторинга загрязненных нефтью почв Приаральского региона и технологий их очистки с использованием новых биопрепаратов».

Литература

1. Liu Y, Hu X, Liu H (2016) Industrial-scale culturing of the crude oil-degrading marine *Acinetobacter* sp. strain HC8-3S. *International Biodeterioration & Biodegradation* 107: 56-61.
2. Oberoi A S, Philip L, Bhallamudi S M (2015) Biodegradation of various aromatic compounds by Tanase A-M, Ionescu R, Chiciudean I, Vassu T, Stoica I (2013) Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 84: 150-154.

Кристаллизация и рентгеноструктурный анализ 17 β - гидроксистероиддегидрогеназы мыши

Буренков Г.¹, Дубова К.М.^{2,3}, Карпов М.В.⁴, Николаева В.М.⁴, Самыгина В.Р.^{2,3},
Стрижов Н.И.⁴

¹ Европейская Молекулярно Биологическая Лаборатория, Германия, г. Гамбург
gleb@embl-hamburg.de

² Институт Кристаллографии ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН,
г. Москва; office@crys.ras.ru

³ НИЦ «Курчатовский Институт», nrcki@nrcki.ru

⁴ ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; rta@ibpm.pushchino.ru

Гидроксистероиддегидрогеназы (ГСД) представляют собой группу стероидных ферментов, которые участвуют в биосинтезе стероидов и их метаболизме. 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (17 β -ГСД) играют ключевую роль в регуляции биологической активности андрогенов и эстрогенов. 17 β -ГСД мыши принадлежит к семейству альдокеторедуктаз и катализирует обратимое превращение андростендиона в тестостерон. Специфические ингибиторы этих ферментов могут быть использованы для лечения гормонозависимых злокачественных опухолей, вызванных андрогенами и эстрогенами [1]. Были получены кристаллы белка двух различных генноинженерных конструкций в виде пластин и плоских призм. Кристаллы обладали слоистостью и дифрагировали от 3 до 1.5 \AA в разных направлениях, что затрудняло обработку данных. После оптимизации условий кристаллизации с использованием робота были выращены игольчатые кристаллы фермента, с которых был собран набор дифракционных данных до 3.5 \AA , позволивший решить структуру. Работа выполнена частично при поддержке Федерального Космического Агентства (рентгеноструктурные исследования) и гранта РФФИ № 14-24-00169 (экспрессия, выделение и очистка белка).

Литература

F. Faucher, L. Cantin, K. P. de Jésus-Tran, M. Lemieux, V. L. The, F. Labrie, R. Breton, J. Mol. Biol. (2007) 369, 525–540

Глюкоза вызывает некроз I типа у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Валиахметов А.Я., Звонарёв А.Н., Абашина Т.Н.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, airatv@ibpm.pushchino.ru

Известно, что инкубация дрожжей *S.cerevisiae* в стационарной фазе с глюкозой в течении нескольких часов приводит к апоптозу клеток – «sugar induced cell death» (SICD). Дальнейшая инкубация с глюкозой завершается разрушением клеток – некрозом II типа. Т.е. некроз является логическим завершением апоптотических процессов в клетке. Считается, что некроз I типа – гибель клетки без видимых признаков предшествующего апоптоза – происходит вследствие серьёзных повреждений, вызванных внешними факторами. Некроз, в отличие от апоптоза, характеризуется нарушением целостности плазматической мембраны. Нами показано, что инкубация дрожжей, находящихся в логарифмической стадии роста, с глюкозой приводит к быстрому увеличению числа клеток, накапливающих пропидий йодид (PI) и 70 кДа FITC-dextran (FD). За 1 час инкубации с глюкозой до 20% клеток становятся проницаемыми для красителей (рис.1).

Данное явление наблюдается только при инкубации дрожжей с глюкозой в воде. При инкубации клеток с глюкозой в богатой среде YP накопления красителей, т.е. нарушение целостности плазматической мембраны не наблюдали. Анализ распределения красителей в популяции клеток методом проточной цитометрии показал, что оба красителя накапливаются в одних и тех же клетках (рис.2).

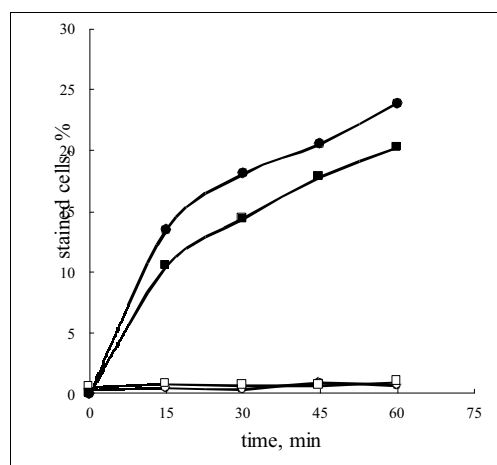


Рис.1 ○ – PI –water, ● – PI – glucose

□ – FD – water, ■ – FD - glucose

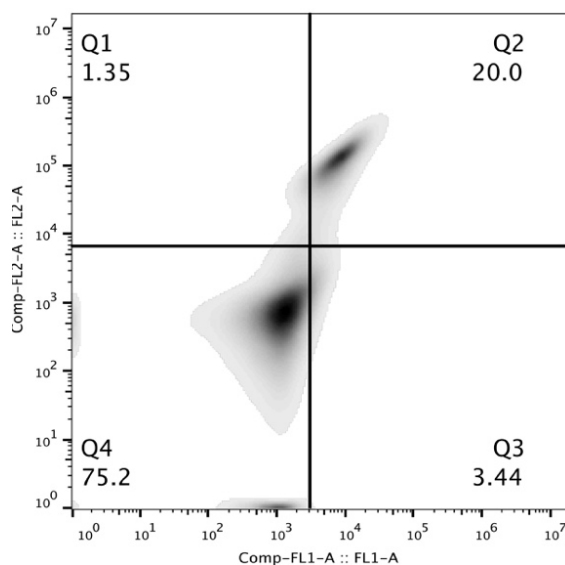


Рис.2 Колокализация FD (FL1) и PI (FL2) в клетках за 1 час

Поскольку молекулярный радиус FD составляет приблизительно 5,8 нм, можно предположить, что разрывы в плазматической мембране достаточно велики для проникновения FD внутрь клетки. Нарушения целостности плазматической мембраны, вызванные инкубацией клеток с глюкозой, необратимы. Перенос клеток после 15 минутной прединкубации с глюкозой в воде в богатую среду (YPD) не восстанавливает барьерную функцию мембраны. О нарушении целостности мембраны говорит также потеря клетками неорганического фосфата. Окраска клеток DAPI показала фрагментацию хроматина, что также является одним из маркеров некроза. Микроскопия показала, что глюкоза нарушала процесс биогенеза вакуолей в ходе клеточного цикла и приводила к их последующему разрушению (Рис.3). Известно, что развитие SICD в клетках дрожжей на 80% угнетается внеклеточным K^+ . Добавление 150 мМ KCl к среде инкубации привело лишь к 30% уменьшению числа некротических клеток. Также известно, что апоптоз (SICD) в значительной степени подавляется аскорбатом – сквенджером ROS (reactive oxygen species). В наших условиях присутствие 10 мМ аскорбата при инкубации с глюкозой не изменило динамику окраски клеток PI, что говорит о нечувствительности процесса разрушения мембраны к веществу-ловушке свободных радикалов.

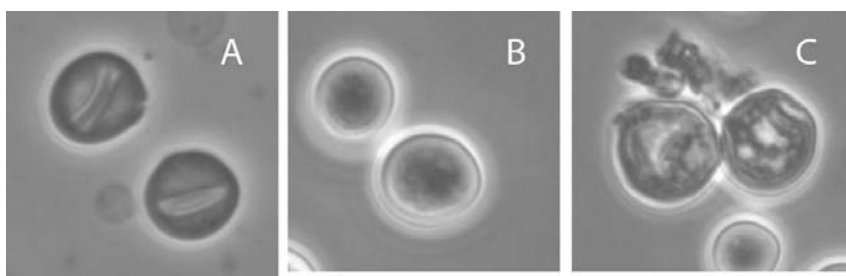


Рис.3 А- «Плоские» вакуоли, готовые к делению; В – глюкоза нарушает этот этап; С- разрушенные вакуоли в клетках инкубированных с глюкозой 1 час

Однако выявлена прямая корреляция между накоплением PI и содержанием ROS в клетках (Рис.4). DHR (1,2,3-dihydrorhodamine – краситель на ROS) и PI колокализовались в одних и тех же клетках (Рис.3 сектор Q2). Таким образом можно заключить, что ROS задействованы в SICD. Однако, в отличие от апоптотического SICD, наблюдающегося в клетках в стационарной фазе роста и развивающегося на протяжении 12-24 часов, SICD в клетках в логарифмической фазе роста протекает очень быстро (15-60 мин) и по некротическому пути.

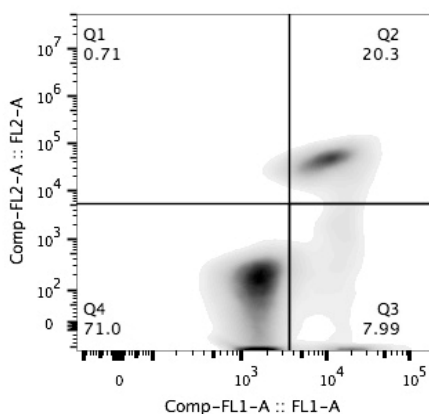


Рис.4 Колокализация DHR (FL1) и PI (FL2) в клетках за 1 час

Выводы. Инкубация клеток дрожжей в логарифмической стадии роста с глюкозой приводит к SICD - быстрому некрозу I типа. Это является основным отличием от SICD в клетках дрожжей в стационарной фазе роста, где наблюдается процесс апоптоза, заканчивающийся некрозом II типа. Полученный вывод подтверждается следующими фактами: 1) быстрый и необратимый разрыв плазматической мембраны; 2) фрагментация хроматина; 3) разрушение вакуолей; 4) слабая чувствительность процесса перфорации мембраны к экзогенному K^+ ; 5) корреляция между процессом образования ROS и нарушением целостности мембраны.

Гетерологическая экспрессия ароматазы и P450-оксидоредуктазы человека в бактериях *Escherichia coli*

Гарцева А. С., Николаева В. М., Карпов М. В., Доновна М. В., Стрижов Н. И

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, г. Пущино

Эстрогены - женские половые гормоны, относятся к числу приоритетных стероидных соединений для разработки новых биотехнологий микробного синтеза. Они используются в терапии различных заболеваний в медицине, а также в качестве предшественников синтеза других важных стероидных лекарственных препаратов.

Цитохром P450 ароматаза (CYP19A1) является единственным ферментом позвоночных, катализирующим биосинтез эстрогенов из их андрогенных предшественников. Процесс катализа происходит с участием партнера P450-оксидоредуктазы (POR) - поставщика электронов. Реакция ароматизации андрогенов включает трехступенчатый процесс гидроксирования при участии трех молекул O_2 и восстановительных эквивалентов (НАДФН) [2] (рис. 1).

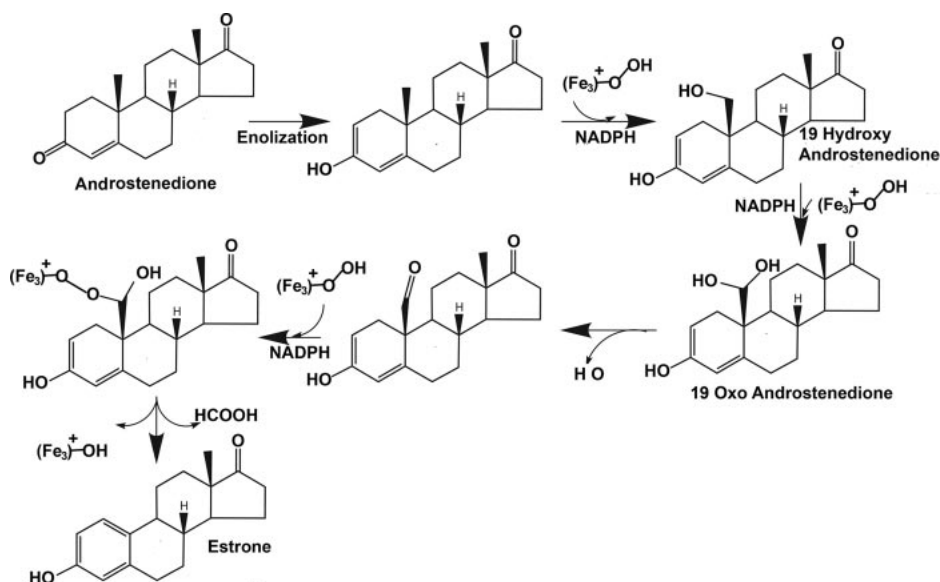


Рис. 1. Схема реакций, катализируемых CYP19A1 [3]

Реакция ароматизации представляет собой существенный механизм поддержания эстроген-андрогенового баланса в человеческом организме. Ингибирование биосинтеза эстрогенов позволяет значительно уменьшить их продукцию, что и является фронтальной линией терапии в постменопаузе эстроген-зависимого рака молочной железы.

Целью настоящего исследования явилось получение рекомбинантных штаммов бактерий, гетерологически экспрессирующих кДНК генов ароматазы (CYP19A1) и P450-оксидоредуктазы человека.

Генетические конструкции, содержащие дицистронный оперон, кодирующий ароматазу и P450-оксидоредуктазу человека, были оптимизированы для экспрессии в микобактериях и химически синтезированы (GeneCust Europe, Люксембург). Два варианта оперона (ароматаза дикого типа и рекомбинантная) были клонированы в плазмидный вектор pET28a, кодирующий N-концевой участок 6xHis-tag. Полученные рекомбинантные плазмиды pC9 и pC10 (Табл. 1) были перенесены в клетки бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3).

Экспрессию кДНК целевых генов анализировали SDS-ПААГ электрофорезом и белковым иммуноблоттингом с помощью конъюгированных антител к 6xHis-tag. Определение активности ферментов, кодируемых рекомбинантными плазмидами pC9 и pC10 проводили *in vitro* с клеточными экстрактами. Реакционная смесь содержала субстрат андрост-4-ен-3,17-дион (АД). Стероидные экстракты анализировали тонкослойной хроматографией с последующей идентификацией продуктов реакции масс-спектрометрическим анализом.

Табл. 1 Характеристика синтетических ДНК-последовательностей и рекомбинантных плазмид

Конструкция	Описание	Плазмиды на основе pET28a
Arowt_POR	ароматаза дикого типа и P450-оксидоредуктаза	pC9
rAro_POR	рекомбинантная растворимая ароматаза и P450-оксидоредуктаза	pC10

Экспрессионный анализ, проведенный в *E. coli* BL21(DE3) бактериях показал, что сконструированная плаزمида pC10 обеспечивала высокий уровень биосинтеза рекомбинантной ароматазы человека. Последующий каталитический анализ выявил присутствие эстрона в исследуемых образцах, что свидетельствует о функциональной активности рекомбинантных белков.

Таким образом, в результате проделанной работы:

- созданы генетические конструкции, несущие синтетические последовательности генов ароматазы и P450-оксидоредуктазы человека в составе одного оперона;
- получены штаммы *E. coli* BL21(DE3), гетерологически экспрессирующие гены ферментной системы ароматазы человека;
- показано наличие каталитической способности рекомбинантных белков к образованию эстрона из АД *in vitro*.

Полученные данные могут служить основой для создания микроорганизмов-продуцентов эстрогенов.

Литература

- [1]. Merlotti D., Gennari L., Stolakis K. [et al.] (2011). Aromatase activity and bone loss in men. *J. Osteoporos*, 1–11.
- [2]. Pandey A.V., Flück C.E. (2013). NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 138, 229–254.
- [3]. Pandey A.V., Kempna' P., Hofer G., Mullis P.E. and Flück C.E. (2007). *Molecular Endocrinology* 21(10), 2579–2595.

Разработка способа биоремедиации грунтов в жарком аридном климате с использованием термотолерантных актинобактерий

Делеган Я.А.¹, Чернявская М.И.², Филонов А.Е.¹

¹ ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушино

² Белорусский государственный университет, г. Минск; mewgia@ya.ru

Одним из основных направлений развития биотехнологии очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов является поиск новых штаммов, способных в монокультуре или в составе микробных консорциумов максимально эффективно утилизировать углеводороды и их производные. Актинобактерии являются известными деструкторами углеводородов различной химической природы. Разнообразие их метаболических возможностей позволяет широко использовать штаммы актинобактерий в технологиях биоремедиации нефтезагрязненных экосистем.

Данное исследование направлено на разработку способа биоремедиации грунтов в жарком аридном климате с использованием термотолерантных актинобактерий. В результате проведенных исследований был разработан опытный образец (прототип) препарата, включающий три штамма актинобактерий: *Gordonia* sp. 1D ВКМ Ac2720D, *Rhodococcus erythropolis* Par7 ВКМ Ac2722D, *R. pyridinivorans* L5A-BSU ВКМ Ac2721D. Биомасса штаммов была лиофильно высушена и смешана в соотношении 1:1:1. Конечная суммарная концентрация бактерий в прототипе препарата составляла 3×10^{10} КОЕ/г сухой биомассы.

Штаммы микробного консорциума были подобраны таким образом, чтобы при их совместном действии происходила деструкция широкого спектра углеводородов из различных фракций нефти. Так, *Gordonia* sp. 1D утилизирует алканы с длиной цепи до C₄₀, *R. pyridinivorans* L5A-BSU способен деградировать полиароматические соединения с количеством колец до 6, *R. erythropolis* Par7 также является активным деструктором алканов. Новизна подхода с использованием данных бактерий состоит в том, что все штаммы эффективно утилизируют нефть и отдельные углеводороды при температурах до 50°C (патент РФ №2617941; Делеган с соавт., 2017) (Рис. 1).

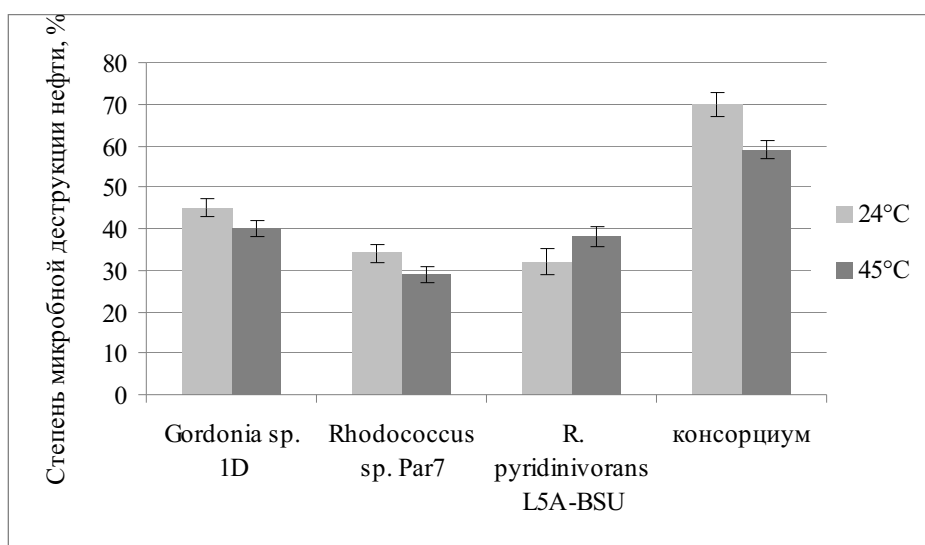


Рис. 1. Степень деструкции нефти штаммами 1D, Par7, L5A-BSU и консорциумом трех штаммов в грунте с 2% нефти, 3% соли и влажностью 10% при 24°C и 45°C. Время эксперимента – 21 сутки.

Для более подробной характеристики метаболических особенностей штамма 1D и его катаболических генов было выполнено секвенирование полного генома штамма *Gordonia* sp. 1D. Секвенирование проводилось на приборе Illumina MiSeq, при этом использовался набор реагентов «MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle)» MS-102-3003. Было получено 518,4 Мб «сырой» информации – 1 143 191 парноконцевых прочтений (длинной до 300 н.п.). Геном собирали в контиги с помощью программы SPAdes-3.10.1. Для определения порядка и ориентации контигов в геноме 1D использовали информацию о *Gordonia amicalis* CCMA-559, *Gordonia amicalis* NBRC 100051, *Gordonia terrae* 3612 и *Gordonia* sp. KTR9 – наиболее близких к 1D штаммов. Размер кольцевой хромосомы штамма 1D составил 5 151 623 п.н. с содержанием G+C 67.3%. Средний размер гена – 965 п.н., интенсивность кодирования 89.4%. Плотность кодирования 0.925 генов на т.п.н. Геном содержит 4 772 последовательностей, предположительно кодирующих белки, 47 генов тРНК и 3 оперона рРНК.

Выявлено, что термотолерантный штамм 1D обладает набором алкангидроксилазных систем, представленных двумя кластерами – *alkB* и *CYP153*. В геноме штамма также содержатся гены пути деструкции нафталина через гентизат, но без генов, кодирующих первые ферменты. Геном штамма 1D обладает большим количеством генов транспозаз, многие из которых, вероятно, активны, что делает геном нестабильным.

Испытания опытного образца препарата были проведены в мае-августе 2017 года на полигоне Курылыс около г. Кызылорда (Казахстан). Температура грунта в дневное время достигала 40-47°C, влажность грунта – около 10%. По результатам испытаний, абиотическая убыль нефти составила 23%, а степень микробной деструкции нефти – 65%. Таким образом, подтверждена эффективность опытного образца препарата в условиях жаркого аридного климата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект Бел_а № 16-54-00200).

Литература

Консорциум термотолерантных бактериальных штаммов для деградации нефти и нефтепродуктов в грунтах и водах в условиях жаркого климата // Патент РФ №2617941, 2017. Бюл. №13. / Делеган Я.А., Ветрова А.А., Чернявская М.И

Микробные консорциумы на основе капсулообразующих микроорганизмов

Дмитриев В.В., Звонарев А.Н.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; dmitriev@ibpm.pushchino.ru

Целью работы является создание новых типов микробных консорциумов путем включения в активные микробные ассоциации капсулообразующих микроорганизмов и использования приемов гранулообразования. Результатом работы должно являться получение высокоэффективных препаратов в виде гранулированных микробных ассоциаций, которые могли бы использоваться с целью повышения нефтеотдачи пластов, очистки окружающей среды от пестицидов, углеводов, тяжелых металлов, других загрязняющих соединений, биотрансформации органических и минеральных соединений.

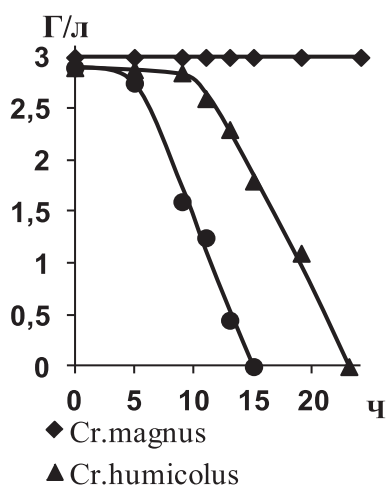


Рис. 1. Рост на Лауроксе-9

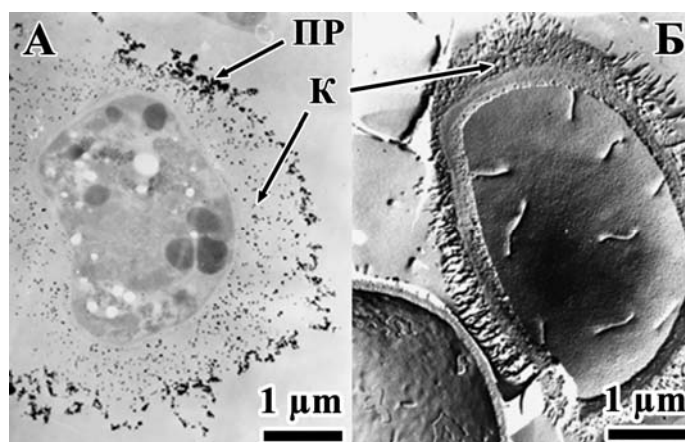


Рис. 2. Электронная микроскопия. А – ультратонкий срез, цитохимическая реакция на гидролазу. Б – Криофрактографический скол. Пр – продукт реакции на гидролазу, К – капсула

Очевидно, что на микробных капсулах, при определенных условиях, происходит иммобилизация чужеродных ферментов, что приводит к амплификации активных ферментативных центров и, в конечном итоге, к повышению эффективности процессов, осуществляемых основным возбудителем (продуцентом ферментов).

Нами было показано у дрожжей и бактерий при росте на углеводородах нефти формирование экзоцеллюлярных образований – трофосом, с иммобилизованными на них ферментами, создающих уникальную трофическую ситуацию для утилизации гидрофобных субстратов в водной среде.[1, 2, 3]

Ранее эта идея была экспериментально проверена [4] на модели двухкомпонентной системы, состоящей из дрожжей *Cryptococcus humicolus* – деструкторов поверхностно-активного вещества лаурокса-9 (донор ферментов) и акцептора – сильнокапсулированных дрожжей *Cryptococcus magnus*, не способных к деструкции этого ПАВ. Установлено, что процесс деструкции ПАВ этой ассоциацией существенно ускорялся (Рис.1). С помощью прецизионных электронно-цитохимических методов показано, что чужеродные ферменты имплантируются в капсулу культуры-акцептора и находятся там в активном состоянии (Рис.2). Таким образом, доказано явление межклеточной (межвидовой) трансплантации биологически активных соединений.

Наличие капсулярных компонентов в смешанных микробных популяциях может приводить, в определенных условиях, к флокуляции и гранулообразованию. Этим достигается эффект искусственного структурирования микробных ассоциаций, наличие в одной и той же грануле метаболически связанных различных видов микроорганизмов. Преимущества такой формы консорциумов очевидны, так как при раздельном внесении микроорганизмов в природные субстраты (воды, нефтяные пласты, илы, и т.д.) значительную отрицательную роль играет фактор пространственного разобщения клеток микроорганизмов. Это особенно сильно должно сказываться в случае использования консорциумов, члены которых составляют единую метаболическую цепочку.

Применение микробов-капсулообразователей обеспечивает не только физическое объединение разнородных микробных компонентов в единой частице-грануле («миниценозы»), но и повышает устойчивость и жизнеспособность клеток в «препаратах», так как известно, что капсулярные полисахариды обладают множественными протекторными функциями и защищают клетки от воздействия экстремальных факторов окружающей среды (например, повышение температуры, облучение, обезвоживание и т.д.). Применение микробов-капсулообразователей экономически эффективно, так как позволяет избежать использования с целью гранулообразования дорогостоящих флокулянтов и искусственных носителей для иммобилизации.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00396 А «Структурно-функциональные перестройки клеточной оболочки дрожжей при адаптации к потреблению углеводов и голоданию.»

Литература

1. Dmitriev V. V. et al. Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media //FEMS microbiology letters. – 2011. – Т. 315. – №. 2. – С. 134-140.
2. Dmitriev V. V. et al. Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions //Yeast. – 2016. – Т. 33. – №. 2. – С. 55-62.
3. Zvonarev A.N. et al. Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates// FEMS Yeast Research. – 2017. – Т. 17. – №. 3.
4. Dmitriev, V. V., et al. Reimmobilization of foreign hydrolases in mixed yeast populations.// Microbiology – 1993. – Т 62 - №.5 – С. 563-565.

Окисление холестерина мутантами *Mycobacterium smegmatis* с инактивированными генами KstR2 - регулона

Довбня Д.В., Брагин Е.Ю., Ивашина Т.В., Донова М.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

Активное изучение катаболизма стерина у актинобактерий обусловлено двумя практическими потребностями: поиском эффективных антибактериальных (противотуберкулезных) лекарственных средств, и развитием биотехнологий прекурсоров для синтеза стероидных фармацевтических субстанций [1]. До настоящего времени в производстве $3\alpha\text{-H-}4\alpha\text{-[3' -пропионат]-}7\beta\text{-метилгексагидро-1,5-индандиона}$ (ГИП) использовали штаммы актинобактерий, полученные методами классического мутагенеза. Основой структуры данного изопреноида являются остатки колец С и D стероидного ядра стерина.

В течение последнего десятилетия накапливаются и систематизируются данные о генетической регуляции путей катаболизма стерина у актинобактерий [2]. Недавно были установлены функции ряда генов, относящихся к KstR2-регулону актинобактерий и

играющих ключевую роль в окислении остатка стероидной молекулы на поздних стадиях его катаболизма [3], что позволяет получать штаммы-продуценты производных гексагидроинданона методами метаболической инженерии.

Цели данной работы – конструирование, анализ катаболического фенотипа и оценка биотехнологического потенциала мутантов *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 с инактивированными генами, контролирующими поздние стадии деградации стероидного ядра.

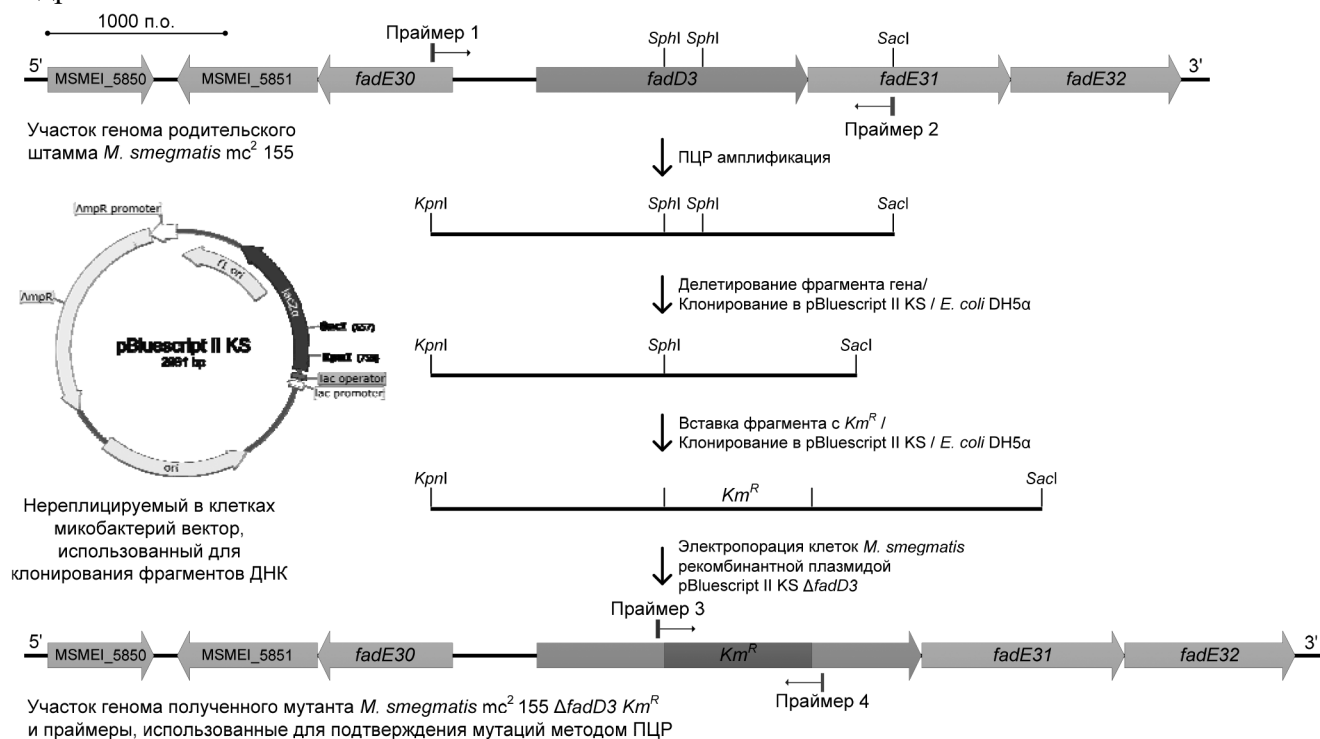


Рис. 1. Стратегия конструирования штаммов *M. smegmatis* с инактивированными генами KstR-регулона (на примере *fadD3*)

Сконструированы рекомбинантные плазмиды и осуществлен нокаут гена *fadD3* (Рис.1), относящегося к KstR2-регулону *M. smegmatis* и кодирующего ацил-КоА синтетазу (НР-КоА синтетазу), и того же гена в сочетании с генами *ipdA, B*, кодирующими α- и β-субъединицы предполагаемой ацил-КоА гидролазы.

Показано, что уровень активности окисления холестерина был различным у мутантов, несущих инсерцию гена антибиотикорезистентности в прямой или обратной ориентации к гену-мишени. В отличие от родительского штамма, который окислял холестерин полностью с образованием незначительного количества интермедиатов, мутанты с генотипом Δ*fadD3* накапливали продукты частичного окисления холестерина. В зависимости от условий, происходило преимущественное накопление одного или двух продуктов. Один из мажорных продуктов биотрансформации холестерина (П1) проявил необычные химические свойства и его не удалось соотнести с каким-либо эталонным веществом, а второй был идентичен ГИП.

Продукт П1 был очищен методами препаративной хроматографии и кристаллизации, его молекулярная масса, химическая формула, структура и стереохимия были подтверждены с использованием методов масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения, протонной, ¹³C, двумерных (COSY, ROESY, HMBC, HCQC) и NOE ЯМР-спектроскопии.

Было показано, что продукт обладает молекулярной массой 224, имеет формулу C₁₃H₂₀O₃ и в кристаллической форме представлен единственным стереоизомером – 4а-гидрокси-ба-метилдекагидроциклопента[ф]хромен-7(8Н)-оном (Рис. 2).

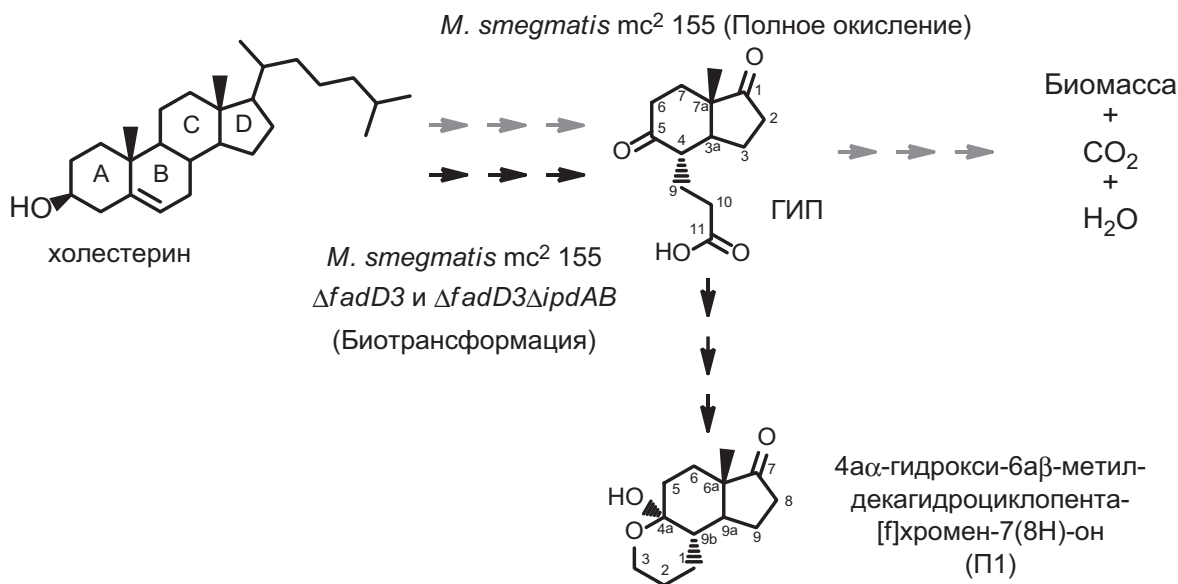


Рис. 2. Биотрансформация холестерина полученными мутантами *M. smegmatis*

Данное соединение не было описано ранее, как интермедиат стероидного катаболизма и в доступной литературе отсутствуют сведения о штаммах, способных накапливать его в качестве основного продукта. Высокий мольный выход (до 95%) и особенности структуры молекулы продукта (гетероциклический полукеталь) позволяют предположить, что он может стать востребованным предшественником для модульного синтеза ценных биологически активных соединений, в частности, производных эстрогена.

Двойные мутанты *M. smegmatis* с генотипом Δ *fadD3* Δ *ipdAB* проявили пониженную активность биотрансформации холестерина в ГИП и П1. Введение второй мутации привело к появлению, как минимум, одного дополнительного продукта, родственного ГИП. Функция ацил-КоА гидролазы, кодируемой генами *ipdA* и *ipdB* была недавно подтверждена как СОСНЕА-СоА гидролазы [4], при этом, СОСНЕА является моноциклическим интермедиатом более глубокого окисления ГИП. Таким образом, появление нового продукта в ответ на нокаут генов *ipdAB* в клетках, не обладающих способностью к деградации ГИП может свидетельствовать о наличии дополнительной активности у кодируемой ими гидролазы.

Литература

1. Донова, М. В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пушино: Изд-во ОНТИ ПНЦ РАН, 2010.
2. Casabon I., Crowe A.M., Liu J., Eltis L.D. (2013) FadD3 is an acyl-CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria. *Mol. Microbiol.*, 87: 269-283.
3. García-Fernández J., Galán B., Medrano F. J. and García J. L. (2015) Characterization of the KstR2 regulator responsible of the lower cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Env. Microbiol. Rep.*, 7: 155–163.
4. Crowe A. M., Casabon I., Brown K. L., Liu J., et al. (2017) Catabolism of the Last Two Steroid Rings in *Mycobacterium tuberculosis* and Other Bacteria. *mBio*, 8(2), e00321–17.

Воздействие ионизирующего излучения на динамику видов микроорганизмов в мясном фарше

Дороничев Ф.В.², Кобялко В.О.², Исамов Н.Н.², Саруханов В.Я.², Полякова И.В.², Губарева О.С.², Фролова Н.А.², Лауринавичюс К.С.¹

¹ ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино; klaur@ibpm.pushchino.ru

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», г. Обнинск

Охарактеризовано развитие биоценоза микроорганизмов в мясном фарше после однократной внешней радиационной нагрузки гамма лучами 0,5, 1,5, 3 и 6 кГрей и инкубации в течение 4, 14, 29 и 60 суток при температуре $3\pm 2^{\circ}\text{C}$. Была определена численность и виды микроорганизмов, доминирующие в пробах. В необлученных контрольных пробах численность была $1,5 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^6$. Облучение приводило к падению численности микроорганизмов более чем в 100 раз и снижению числа доминирующих видов. При увеличении дозы ионизирующего излучения уменьшалось число доминирующих видов и численность живых микроорганизмов. При увеличении времени инкубации также падало число доминирующих видов, причем эффект был больше при высокой нагрузке ионизирующего излучения.

Показано, что радиационная нагрузка снижает численность живых микроорганизмов, но не приводит к стерильности образца. Число доминирующих видов падает при увеличении дозы ионизирующего излучения и при увеличении времени инкубации.

Динамика доминирования видов микроорганизмов в пищевых пресервах сельди после радиационной обработки

Дороничев Ф.В.², Кобялко В.О.², Исамов Н.Н.², Саруханов В.Я.², Полякова И.В.², Губарева О.С.², Фролова Н.А.², Лауринавичюс К.С.¹

¹ ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино; klaur@ibpm.pushchino.ru

² ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии», г. Обнинск

Микроорганизмы более устойчивы к излучениям, чем животные и растительные организмы, однако у разных видов чувствительность варьирует в широких пределах. Радиопоражаемость микроорганизмов одного и того же вида изменяется в зависимости от температуры, дозы и длительности облучения, возраста клеток, pH и состава среды, доступа кислорода и/или редуцирующих соединений, взаимодействия с окружающими микроорганизмами. Все это не позволяет количественно предсказать результаты облучения микроорганизмов гамма лучами.

Мы охарактеризовали биоценоз микроорганизмов в пресервах сельди после внешней радиационной нагрузки гамма лучами 4 кГрей и инкубации в течении 70 и 150 суток при температуре $3\pm 2^{\circ}\text{C}$. Была определена численность микроорганизмов и виды, доминирующие в пробах.

Облучение приводило к падению численности микроорганизмов и вариабельности таксономического положения доминирующих видов независимо от времени инкубации. Наличие в среде бензоата натрия (консервант) при облучении мало повлияло на численность микроорганизмов в пробе, однако существенно изменило их состав. После 70 суток инкубации в пробах преобладали *Candida zeylanoides* с последующим

восстановлением таксономической вариабельности доминирующих видов микроорганизмов после 150 суток.

Таким образом, показано, что радиационная нагрузка снижает численность живых микроорганизмов, но не приводит к стерильности образца. Однако небольшие изменения условий воздействия могут определять, какие виды будут доминировать.

Предварительный рентгеноструктурный анализ 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы мышцы

Дубова К.М.^{1,2}, Самыгина В.Р.^{1,2}, Карпов М.М.^{3,4}, Николаева В.М.³, Стрижов Н.И.³

¹Институт Кристаллографии ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН,
г. Москва

²НИЦ «Курчатовский Институт», г. Москва

³ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

⁴ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт»
nicolai@strizhov.de

17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (17 β -ГСД) играют ключевую роль в регуляции биологической активности андрогенов и эстрогенов. 17 β -ГСД мышцы принадлежит к семейству альдокеторедуктаз и катализирует обратимое превращение андростендиона в тестостерон. Несмотря на высокую гомологичность белков этого семейства, они отличаются активностью и субстратной специфичностью.

Детальный рентгеноструктурный анализ (РСА) позволяет определить нюансы механизма катализа и найти путь модификации функции белков.

Синтетическая кДНК мышечной 17 β -ГСД 5-го типа была экспрессирована в *E. coli*. Фермент был очищен до гомогенного состояния металл-хелатной аффинной хроматографией с носителем ИМАС с последующим отщеплением His-tag с помощью тромбина и TEV-протеазы.

Была проведена кристаллизация двух различных генно-инженерных конструкций методом диффузии в парах с использованием полиэтиленгликолей различного молекулярного веса. Кристаллы апоформы белка и комплекса с НАДФ в виде пластин и плоских призм выросли в течение 3-4 недель до 0.1-0.2 мм.

По результатам предварительного тестирования дифракционного качества с использованием синхротронного излучения кристаллы принадлежат к моноклинной сингонии. Кристаллы характеризовались структурной неоднородностью и сильной анизотропией, дифрагировали от 3 до 1.5 Å в разных направлениях (данные в процессе обработки).

В результате оптимизации условий кристаллизации с целью улучшения дифракционного качества выращены изометричные кристаллы апоформы фермента, пригодные для РСА.

Работа выполнена при частичной поддержке Федерального Космического Агентства (рентгеноструктурные исследования).

Функциональные особенности серинового цикла у метанотрофов

С.В. Егорова^{1,2}, С.Ю. Бут², В.Н. Хмеленина², Ю.А. Троценко^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

² ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пушкино

Метанотрофы - специализированная группа бактерий, использующих метан или метанол в качестве единственных источников углерода и энергии. Метилотрофы получают энергию, окисляя C1-субстрат до углекислого газа в нескольких последовательных реакциях. Углерод при этом фиксируется на уровне формальдегида или углекислого газа в одном из трех путей: рибулозомонофосфатном (метанотрофы I типа), сериновом (метанотрофы II типа) или цикле Кальвина (X тип и филум *Verrucomicrobia*). Анализ секвенированных геномов показывает присутствие генов, кодирующих ферменты серинового пути, у большинства метанотрофов и не растущих на метане метиловых бактерий, включая штаммы, ассимилирующие углерод главным образом через рибулозомонофосфатный путь и/или цикл Кальвина. При этом роль серинового цикла у метанотрофов I и X типов остается невыясненной.

Цель исследования: определение функций и роли серинового цикла у метанотрофных бактерий, реализующих различные пути ассимиляции формальдегида.

Филогенетический анализ выявил, что Sga и Hrg метилотрофных бактерий разделяются на две группы, причем ферменты метанотрофов, реализующих, помимо серинового пути, РМФ-цикл и цикл Кальвина, относятся к одной из них, а ферменты метанотрофных бактерий и не растущих на метане метиловых бактерий, реализующих сериновый цикл в качестве единственного пути ассимиляции C1-соединений – к другой. Данный факт подразумевает различное происхождение ферментов серинового пути у бактерий, составляющих разные группы и, по-видимому, их различные функции.

Клонированием и гетерологичной экспрессией в *E. coli* нами были получены рекомбинантные препараты серин-глиоксилат аминотрансфераз из *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z (метанотроф I типа) и *Methylosinus trichosporium* Ob3B (метанотроф II типа), а также гидроксипируватредуктазы из *Mm. alcaliphilum* 20Z, *Ms. trichosporium* Ob3B и *Methylococcus capsulatus* Bath (метанотроф X типа) и изучены их биохимические свойства.

Sga изучаемых метанотрофов демонстрировали схожие свойства: $V_{max} = 13$ Ед/мг, $K_m^{серин} = 2,6$ мМ, $K_m^{глиоксилат} = 0,26$ мМ для фермента из *Mm. alcaliphilum* 20Z и $V_{max} = 20$ Ед/мг, $K_m^{серин} = 2,1$ мМ, $K_m^{глиоксилат} = 0,17$ мМ для серин-глиоксилат аминотрансферазы из *Ms. trichosporium* Ob3b.

В то же время, кинетические параметры Hrg штаммов 20Z, Ob3b, дают основания полагать, что регуляция серинового цикла происходит на уровне активности именно этого фермента, а не Sga. Все три фермента катализировали НАД(Ф)Н-зависимое восстановление гидроксипирувата, а также глиоксилата, но не обратные реакции окисления глицерата или гликолата. Активность и сродство к основному субстрату у гидроксипируватредуктазы из *Ms. trichosporium* Ob3b были значительно выше, чем у двух других ферментов, а также слабее ингибировалась гидроксипируватом. Это согласуется с тем фактом, что у метанотрофов II типа сериновый цикл является единственным путем ассимиляции углерода метана. В то же время ферменты из *Mm. alcaliphilum* 20Z и *Ms. capsulatus* Bath демонстрируют примерно одинаковую каталитическую активность для обоих субстратов.

Логично полагать, что основной физиологической ролью Hrg у метанотрофов II типа является восстановление гидроксипирувата, в то время как у метанотрофов I и X типов Hrg может также выступать в качестве глиоксилатредуктазы, причем соотношение этих двух реакций регулируется соотношением концентраций НАДН₂ и НАДФН₂ в клетке.

Методом инсерционного мутагенеза были получены штаммы *Mm. alcaliphilum* с инактивированным геном *sga*, а также с одновременно инактивированными генами *sga* и *hpr*. Было отмечено замедление скорости роста у мутантов по сравнению со штаммом дикого типа, при росте, как на метане, так и на метаноле (Рис. 1), при чем при пересеве с метана на метанол, наблюдалась продолжительная лаг-фаза у мутантных штаммов.

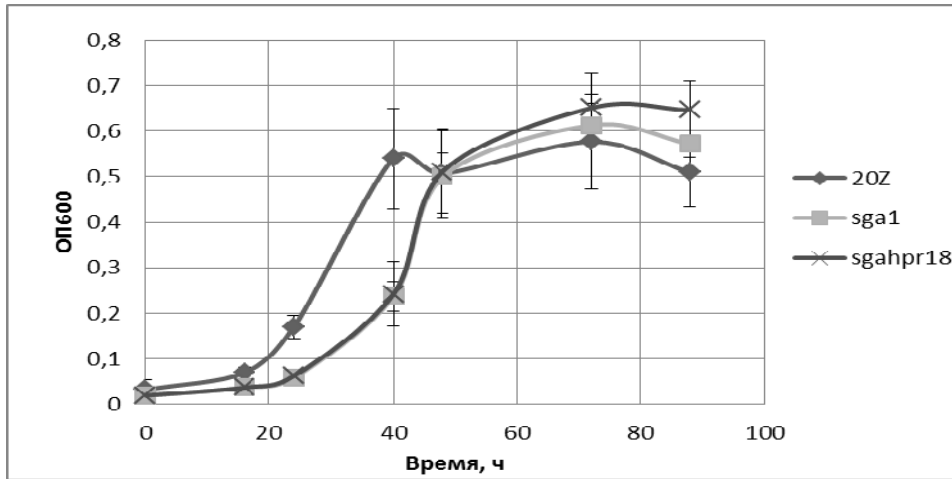


Рис. 1. Кривые роста дикого и мутантных штаммов *Mm. alcaliphilum*

При этом при росте на метаноле у мутантов было отмечено накопление формальдегида в культуральной жидкости даже в стационарной фазе, в то время, как дикий тип полностью метаболизирует накопленный в ранней фазе формальдегид (Рис. 2).

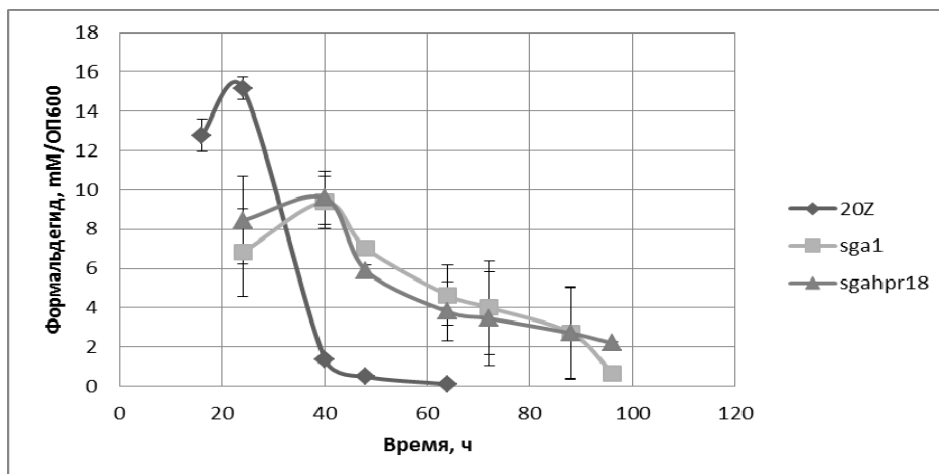


Рис. 2. Продукция формальдегида диким и мутантными штаммами *Mm. alcaliphilum* при росте на метаноле.

В связи с этим можно предположить, что сериновый путь служит альтернативным путем для ассимиляции избыточного формальдегида у *Mm. alcaliphilum*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №17-04-11113.

Транскрипционная регуляция гена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы у *Methylobacterium radiotolerans*

Екимова Г.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; ekimova_g@mail.ru

Аэробные метилотрофные бактерии, использующие метан и его окисленные или замещенные производные в качестве источников углерода и энергии широко распространены в природе и часто являются симбионтами растений. Взаимосвязь обусловлена, с одной стороны, тем, что растения выделяют метанол и другие C₁-соединения, которые потребляют метилотрофы. С другой стороны, метилотрофы стимулируют рост растений за счет биосинтеза фитогормонов и витаминов. При росте на поверхности и внутри тканей растений бактерии могут использовать в качестве источников питания различные метаболиты растений, такие как аминокислоты. Особую роль в фитосимбиозе занимает деградация бактериями 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) – предшественника в биосинтезе этилена растениями. Этилен - один из основных фитогормонов, сверхпродукция которого в стрессовых условиях приводит к запуску программы старения растений, опадению листьев, преждевременному опадению плодов. Бактерии, обладающие ферментом деградации АЦК – АЦК-дезаминазой способствуют повышению устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям.

Транскрипционная регуляция гена АЦК-дезаминазы (*acdS*) изучена только у *Pseudomonas putida* UW4. Выше *acdS* располагается ген *acdR*, кодирующий регулятор из *lrp*-семейства (leucine responsive protein), который в комплексе с АЦК и белком *AcdB*, связываясь с областью промотора гена *acdS*, активирует его транскрипцию. АЦК-дезаминаза расщепляет АЦК до аммиака и α -кетобутирата - предшественника лейцина. При высокой концентрации лейцина *lrp*-октамер распадается, останавливая транскрипцию *acdS*. Поиск генов АЦК-дезаминаз среди аэробных метиловых бактерий выявил, что геном *acdS* обладает ряд представителей рода *Methylobacterium*, многие из которых - симбионты растений. Анализ *in silico* генома *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 показал, что выше структурного гена *acdS* расположен ген *acdR*, транскрибирующийся в обратном направлении, однако, не обнаружена последовательность, сходная с геном *acdB* *P. Putida* (рис. 1).

У *M. radiotolerans* JCM2831 ген *acdR* кодирует белок, который проявляет сходство с известными транскрипционными регуляторами *lrp*-семейства. Рекомбинантный белок *AcdR* *M. radiotolerans* получен при помощи гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* и последующей металл-хелатной хроматографии. Молекулярная масса субъединицы *AcdR* составила 18 кДа, что соответствует теоретически рассчитанной. *AcdR* *M. radiotolerans* кластеризуется совместно с белками альфапротеобактерий, проявляя довольно высокий процент идентичности (до 79,2% с *M. variable* DSM16961). Несмотря на это, *AcdR* *M. radiotolerans* образует отдельную ветвь совместно с аминокислотными последовательностями белков нескольких представителей метиловых бактерий.

При помощи гомологической рекомбинации получены мутанты *M. radiotolerans* с делециями в гене *acdS* и *acdR*. Мутантов комплементировали как исходным вектором p7A-29, служившим отрицательным контролем, так и плазмидами, несущими нокаутированный ген (p7A-36 для гена *acdS* и p7A-136 для гена *acdR*). В результате исследования ферментативной активности в бесклеточных экстрактах выявили, что мутанты *M. radiotolerans* Δ *acdS* и Δ *acdR* не обладают активностью АЦК-дезаминазы как с индуктором (2-аминоизобутират), так и без него, в отличие от исходного штамма, в котором активность фермента проявлялась в присутствии индуктора. Комплементированные исходным вектором мутанты Δ *acdS*/p7A-29 и Δ *acdR*/p7A-29 не обладали активностью АЦК-дезаминазы, аналогично бесплазмидным мутантам.

Комплементированный мутант $\Delta acdR/p7A-136$ в присутствии индуктора проявлял активность АЦК-деаминазы на уровне штамма дикого типа, однако, в отсутствие индуктора, в отличие от исходного штамма JCM2831, также наблюдали активность фермента. Это связано, по-видимому, с избыточной концентрацией регуляторного белка в клетках комплементированного штамма, что облегчает инициацию транскрипции с промотора *acdS* даже в отсутствие индуктора. Комплементированный мутант $\Delta acdS/p7A-36$ проявлял очень высокую ферментативную активность независимо от индуктора, что неудивительно, поскольку ген *acdS* в нём находится под контролем сильного конститутивного промотора метанолдегидрогеназы *mxhF*.

С использованием ^{32}P - меченых праймеров Mr-*acdR*-68r и P-*acdS*R, комплементарных фрагментам ДНК, находящимся на расстоянии, соответственно, 278-298 п. н. и 124-142 п. н. выше стартового кодона гена *acdS* *M. radiotolerans*, получен ПЦР-фрагмент, содержащий регуляторный участок гена *acdS* (рис. 1).

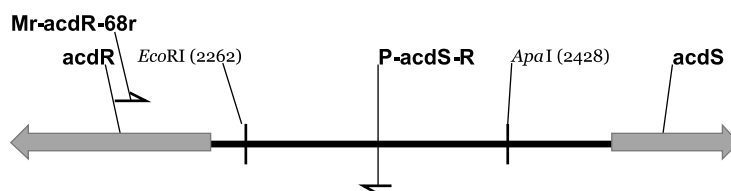


Рис. 1. Межгенный участок *acdS*-*acdR* *M. radiotolerans*

Установлено, что добавление рекомбинантного белка *AcdR* приводит к уменьшению электрофоретической подвижности специфического ПЦР-фрагмента в присутствии гетерологичной ДНК и АЦК. Для связывания 1 пкмоль ДНК *in vitro* требуется от 23 пкмоль регуляторного белка при максимальном количестве АЦК 1000 нмоль. При исследовании зависимости связывания *AcdR* от концентрации АЦК показано, что связывание 1 пкмоль ДНК с 23 пкмоль *AcdR* начинается в присутствии не менее чем 12 нмоль АЦК. Таким образом, АЦК является низкомолекулярным эффектором белка-регулятора, связывание с которым вызывает конформационные изменения в молекуле белка, в результате чего увеличивается аффинность *AcdR* к операторному участку ДНК. Также показано, что в результате рестрикции ПЦР-фрагмента по сайту *EcoRI* *AcdR* полностью утрачивает способность связываться с фрагментами ДНК, это указывает на присутствие в этой области сайта связывания *AcdR*.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляторный белок *AcdR* *M. radiotolerans* является активатором транскрипции гена *acdS* в присутствии индукторов (АЦК или 2-аминоизобутирата). В отличие от *P. putida* UW4 *AcdR* у *M. radiotolerans*, по-видимому, является единственным регуляторным белком, участвующим в связывании промотора *acdS*. У *P. putida*, напротив, два белка *AcdR* и *AcdB* координированно регулируют экспрессию гена АЦКД. Интересно, что у псевдомонад АЦК не влияет на связывание *AcdR* с ДНК, тогда как этот комплекс диссоциирует в присутствии лейцина. *AcdB*, принадлежащий к группе фосфодиэстераз при этом связывается исключительно при наличии АЦК в реакционной смеси, а добавление лейцина не приводит к распаду образовавшегося *AcdB*-ДНК. Однако в присутствии лейцина комплекс *AcdR*-*AcdB*-ДНК разрушается, останавливая транскрипцию гена, кодирующего АЦКД. В случае *M. radiotolerans* добавление лейцина не влияет на образование комплекса *AcdR*-АЦК-ДНК.

Таким образом, проведенное исследование регуляции экспрессии АЦК-деаминазы позволило получить новые данные о механизмах воздействия бактерий на растения. Работа является фундаментальной основой для дальнейших молекулярно-биохимических исследований организации и регуляции фитосимбиоза у аэробных метиловых бактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-04-00381_a.

Особенности кривых ответ-концентрация для модели амперометрического микробного сенсора на мальтозу

Емельянова Е.В., Решетилов А.Н.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; elenvem@ibpm.pushchino.ru

Мальтоза – это природный дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы. Получают мальтозу ферментативным осахариванием крахмала (мальтозная патока). В виде мальтозной патоки её широко применяют в пищевой промышленности.

Кроме классических методов (газовая и жидкостная хроматография) для определения мальтозы используют биосенсорный метод анализа. В Лаборатории биосенсоров ИВФМ РАН была разработана лабораторная модель амперометрического микробного сенсора для определения мальтозы. В этой модели преобразователем служил кислородный электрод Кларка. Рецептором, закреплённым на измерительной поверхности электрода, - иммобилизованные на мембране клетки бактерий рода *Pseudomonas*. Принцип действия биосенсора заключался в следующем: после внесения раствора мальтозы в измерительную кювету изменялась скорость потребления кислорода клетками рецептора. Кислородный электрод преобразовывал химический сигнал (концентрация кислорода) в электрический. Регистрируемым параметром биосенсора была максимальная скорость изменения силы тока, dl/dt (далее ответ биосенсора, $\mu A/c$), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации кислорода, потреблённого иммобилизованными клетками рецептора в ответ на внесение мальтозы. Концентрацию мальтозы оценивали по скорости изменения силы тока в ответ на внесение пробы, содержащей мальтозу, используя калибровочную зависимость.

Известно, что ответ микробного сенсора на субстрат, является комплексной реакцией микробных клеток, служащих основой рецептора (в дальнейшем будем их называть – клетки культуры-рецептора). При внесении субстрата в измерительную кювету активизируется как метаболизм клеток, так и процессы транспорта субстрата в клетки культуры-рецептора. В настоящее время в клетках некоторых культур обнаружены бифазные системы для транспорта субстрата в клетку.

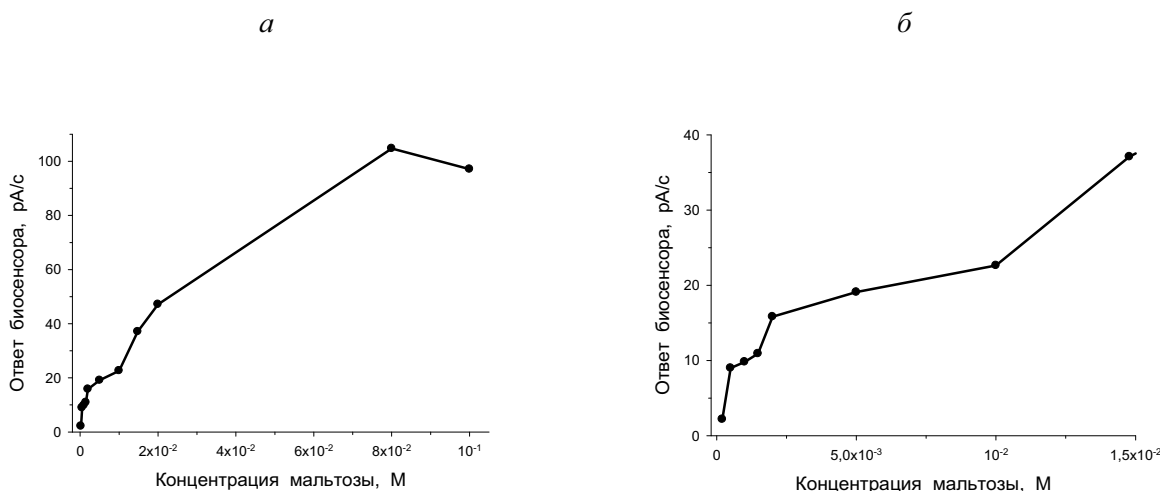


Рис 1. Зависимость ответа биосенсора от концентрации мальтозы для всего интервала исследованных концентраций (а) и для области низких концентраций субстрата (б) при использовании GF/A в качестве мембраны.

Для разработанной модели биосенсора анализ зависимостей ответ-концентрация показал, что полученные кривые могли быть описаны эмпирическим уравнением,

предложенным Хиллом $V = V_{max} \cdot S^n / (S_{0,5}^n + S^n)$, где V_{max} максимальная скорость ответа на субстрат (т.е. ответ сенсора при $S \rightarrow \infty$); $S_{0,5}$ концентрация субстрата (S), при которой $V = 0.5V_{max}$; n – коэффициент Хилла. Причём кривые имели три точки перегиба – два промежуточных плато: три интервала со своими значениями кинетических констант V_{max} и $S_{0,5}$ (рис. 1). То есть свойства клеточного аппарата, ответственного за генерацию сигнала культуры-рецептора, менялись при увеличении концентрации мальтозы от 1×10^{-6} М до 0.1 М. Переход от первой системы генерации сигнала ко второй наблюдали при концентрации мальтозы $\sim 1-2 \times 10^{-4}$ М, а от второй к третьей при $S \sim 1-2 \times 10^{-2}$ М.

Известно, что интенсивность метаболизма субстрата и скорость его поступления в микробную клетку определяются активностью задействованных в этих процессах комплексов ферментов и систем транспорта. На их активность, как и следовало ожидать, оказывал влияние не только состав среды, используемой для роста клеток культуры-рецептора, но и индукция мальтозой (активация клеток мальтозой в неростовых условиях). При этом существенным образом менялась скорость реакции на мальтозу (Рис.2).

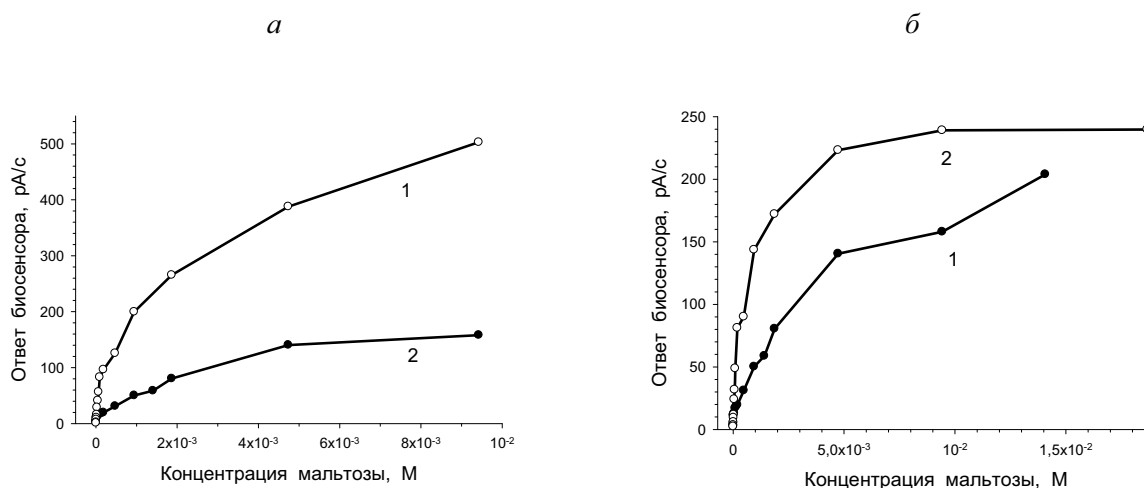


Рис. 2. Кривые ответ-концентрация биосенсора на основе клеток, выращенных на различных средах (а: 1- рост на СА; 2 – рост на агаризованной пептон-триптонной среде), и клеток, индуцированных мальтозой после роста на пептон-триптонной среде (б: 1 - до индукции; 2 – после индукции мальтозой).

На величину кинетических констант сенсора (максимальная скорость ответа на субстрат и константа полунасыщения) оказывал влияние не только субстрат, но и методика формирования модели сенсора: материал, используемый для иммобилизации микробных клеток, и время хранения выросших клеток и рецепторного элемента (рис. 3).

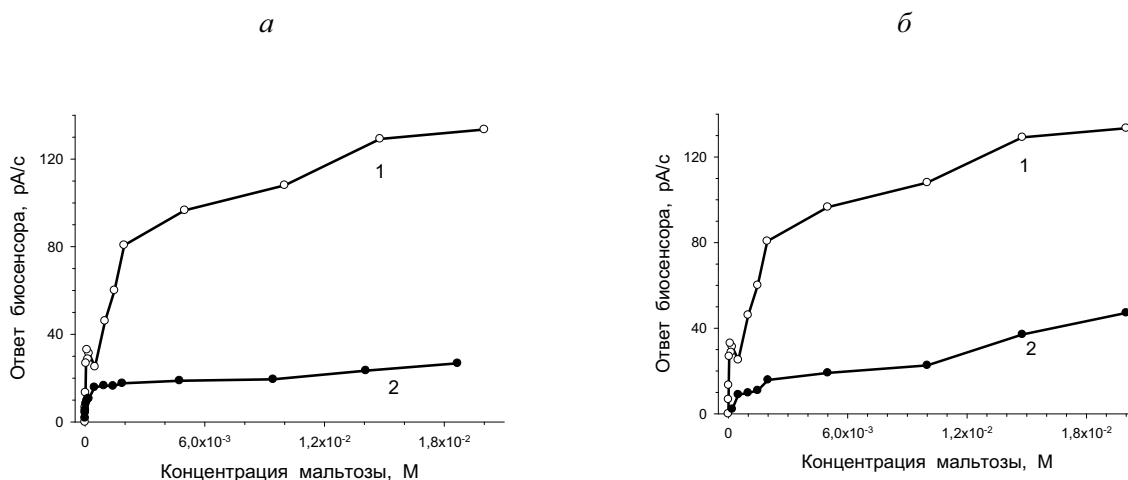


Рис. 3. Влияние времени хранения клеток и рецепторного элемента (*а*: 1 – "свежие"; 2 – "старые" препараты) и материала для иммобилизации клеток (*б*: 1 - GF/C; 2 - GF/A) на характеристики кривых ответ-концентрация

Очевидно, что детальный анализ кривых и определение кинетических констант поможет не только лучше понять, какие процессы участвуют в формировании ответа биосенсора, но и позволит разобраться в механизме их действия.

Особенности наследования плазмид биodeградации ϵ psilon-капролактама и нафталина в почвенных и ризосферных штаммах псевдомонад

Есикова Т.З., Анохина Т.О., Ахметов Л.И., Кошелева И.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; das3534@rambler.ru

Способность к утилизации ксенобиотиков и компонентов нефти у бактерий рода *Pseudomonas* часто контролируется плазмидами групп несовместимости P-2, P-7 и P-9 (Smalla et al., 2015). Принадлежность плазмиды к той или иной группе несовместимости определяет круг ее бактериальных хозяев, способность к стабильному существованию в клетке хозяина, а, следовательно, судьбу генов биodeградации в бактериальных популяциях.

Некоторые представители ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* способны улучшать рост растений за счет синтеза фитогормонов и защиты растений от фитопатогенов. Такие полезные для растений бактерии объединяют в специфическую группу, которую принято называть PGPR *Pseudomonas* (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Lugtenberg and Kamilova, 2009). Для использования плазмидосодержащих штаммов-деструкторов в фиторемедиационных технологиях целесообразно изучать перенос катаболических плазмид и стабильность их наследования в PGPR *Pseudomonas*, а также условия, способствующие распространению плазмид биodeградации в бактериальных популяциях.

Целью настоящей работы являлось изучение способности катаболических плазмид IncP-9 (на примере плазмид биodeградации ϵ psilon-капролактама и нафталина) к конъюгационному переносу в штаммы PGPR *Pseudomonas* и характера их наследования в этих штаммах.

Характер наследования CAP плазмид в бактериях рода *Pseudomonas*. В различные штаммы псевдомонад, в том числе, почвенные (*P. putida*), ризосферные (*P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. protegens*) и штамм *P. aeruginosa* ML4262 при помощи

конъюгационного переноса были переданы CAP плазмиды, относящиеся к группам несовместимости P-2 (pBS262), P-7 (pBS270) и P-9 (pBS267, pBS268 pBS265) (табл. 1). Частота конъюгационного переноса большинства CAP плазмид в ризосферные штаммы и в *P. aeruginosa* была ниже, чем в штаммы *P. putida* в среднем на один порядок и составляла около 10^{-7} – 10^{-8} .

Было обнаружено, что стабильность наследования CAP плазмид при культивировании бактерий в неселективных условиях зависит от их принадлежности к той или иной группе несовместимости, а также от штамма бактерии-хозяина. Так, все исследуемые CAP плазмиды стабильно поддерживались в *P. putida* KT2442 и BS394 в течение 100 генераций. Однако в клетках ризосферных псевдомонад стабильно поддерживались только плазмиды pBS262 и pBS270, принадлежащие к P-2 и P-7 группам несовместимости соответственно (табл. 1). Плазмиды pBS265, pBS267, pBS268 (все относятся к IncP-9, но выделены из разных географических районов и/или отличаются по размерам) полностью элиминировались из клеток ризосферных псевдомонад в течение нескольких генераций.

Табл. 1. Стабильность наследования CAP плазмид в различных штаммах *Pseudomonas*

Реципиентный штамм	pBS262 IncP-2 450 kb	pBS270 IncP-7 100 kb	pBS267 IncP-9 140 kb	pBS268 Inc P-9 100 kb	pBS265 IncP-9 140 kb
<i>P. aeruginosa</i> ML4262	100*	100	100	100	100
<i>P. putida</i> KT2442	100	100	100	100	100
<i>P. putida</i> BS394**	100	100	100	100	100
Ризосферные псевдомонады (PGPR <i>Pseudomonas</i>)					
<i>P. chlororaphis</i> BS1393	96	100	2	0	0
<i>P. chlororaphis</i> OV17	58	89	0	0	0
<i>P. protegens</i> 38a	75	98	10	0	12
<i>P. fluorescens</i> 2-79	89	99	0	0	2
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	93	100	0	0	6

Примечание: * данные приведены в % после культивирования штаммов в неселективных условиях в течение 100 генераций.

** донорами плазмид служили природные штаммы-деструкторы капролактама *P. putida*. Во всех остальных скрещиваниях донорами плазмид служили варианты ауksотрофного штамма *P. putida* BS394, содержащие указанные CAP плазмиды.

Известно, что плазмиды IncP-9 характеризуются полиморфностью генетических детерминант, обеспечивающих инициацию репликации. На основании сиквенс-анализа

выделено 8 подгрупп плазмид, отличающихся между собой по составу нуклеотидных последовательностей *rep*-гена и *oriV*-сайта, при этом исследуемые CAP плазмиды формируют отдельные ветви (γ -подгруппа) на филогенетическом древе IncP-9 плазмид (Sevastyanovich et al., 2008). Поскольку *rep*-область служит основной функциональной единицей, определяющей поддержание внехромосомного элемента в бактериальной популяции, представлялось интересным выяснить характер наследования плазмид других подгрупп IncP-9 в клетках почвенных и ризосферных псевдомонад. Для этого был осуществлен перенос плазмид биodeградации нафталина pBS216 (δ -подгруппа) и NAN7 (ζ -подгруппа) в соответствующие реципиентные штаммы.

Характер наследования NAN плазмид в бактериях рода *Pseudomonas*. Как и в случае с CAP плазмидами, перенос pBS216 и NAN7 в штамм *P. putida* KT2442 происходил с более высокой частотой (10^{-6} – 10^{-7}), чем в штаммы PGPR *Pseudomonas* (10^{-8} – 10^{-9}). Низкая частота переноса плазмид в штаммы PGPR *Pseudomonas* может быть связана с выделением ими антибиотически активных метаболитов, подавляющих рост микроорганизмов. Поэтому была изучена антагонистическая активность PGPR *Pseudomonas* по отношению к *P. putida* BS394, который служил донором в большинстве скрещиваний. Эксперименты показали, что штаммы *P. chlororaphis* BS1393, OV17, PCL1391, *P. protegens* 38a не подавляли рост бактерий *P. putida* BS394 (рис. 1).

Из тестированных ризосферных штаммов только *P. fluorescens* 2-79 (продуцент феназин-1-карбоновой кислоты) проявлял антагонистическую активность по отношению к *P. putida* BS394, тем не менее конъюгационный перенос исследуемых плазмид из BS394 в штамм *P. fluorescens* 2-79 происходил с той же частотой, что и в другие ризосферные псевдомонады. Таким образом, выделение антибиотически активных метаболитов штаммами PGPR *Pseudomonas* не является причиной низкой частоты конъюгационного переноса плазмид биodeградации в них, а обусловлено другими причинами.

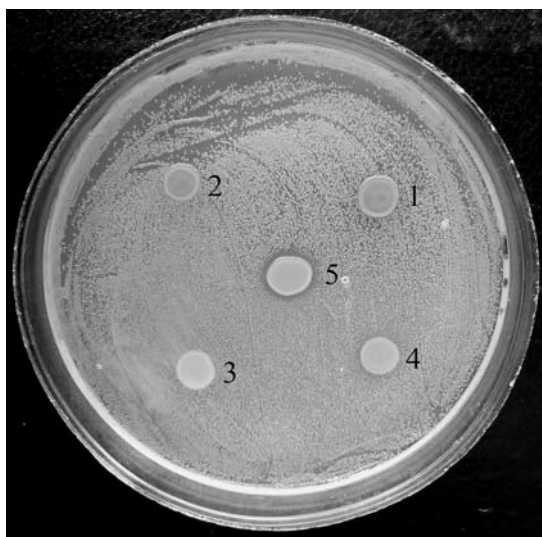


Рис. 1. Подавление *P. putida* BS394 (газон) штаммами PGPR *Pseudomonas*.

1 – *P. chlororaphis* BS1393, 2 – *P. chlororaphis* OV17, 3 – *P. chlororaphis* PCL1391, 4 – *P. protegens* 38a, 5 – *P. fluorescens* 2-79 (в центре).

Сравнительный анализ стабильности NAN плазмид в бактериях *Pseudomonas* выявил ту же закономерность, что и для CAP плазмид (табл. 2). Плазмиды pBS216 и NAN7 стабильно наследовались в клетках *P. putida* KT2442 и *P. putida* BS394 и с высокой частотой элиминировались из ризосферных штаммов *P. chlororaphis* PCL1391, BS1393, OV17, *P. fluorescens* 2-79 и *P. protegens* 38a. В большинстве случаев плазмиды не обнаруживались в клетках реципиентов уже после 20–30 генераций. Исключение

составлял штамм *P. chlororaphis* PCL1391(pBS216), в котором около 60% популяции сохранили плазмиду после 100 генераций (табл. 2).

Табл. 2. Стабильность наследования НАН плазмид в различных штаммах *Pseudomonas*

Реципиентный штамм	pBS216 IncP-9, δ -подгруппа		NAH7 IncP-9, ζ -подгруппа	
	30 генераций	100 генераций	30 генераций	100 генераций
<i>P. putida</i> KT2442	100*	100	100	98
<i>P. putida</i> BS394**	100	100	100	100
Ризосферные псевдомонады (PGPR <i>Pseudomonas</i>)				
<i>P. chlororaphis</i> BS1393	30	0	0	0
<i>P. chlororaphis</i> OV17	0	0	0	0
<i>P. protegens</i> 38a	100	2	0	0
<i>P. fluorescens</i> 2-79	0	0	0	0
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	81	60	0	0

Примечание:

* данные приведены в % после культивирования штаммов в неселективных условиях в течение 100 генераций.

** донорами плазмид служили природные штаммы-деструкторы нафталина *P. putida*. Во всех остальных скрещиваниях донорами плазмид служили варианты ауксотрофного штамма *P. putida* BS394, содержащие указанные НАН плазмиды.

Таким образом, в ходе настоящего исследования выявлены особенности наследования катаболических плазмид IncP-9 в клетках ризосферных псевдомонад. На примере CAP и НАН плазмид, относящихся к различным подгруппам IncP-9, показана высокая степень их нестабильности в штаммах PGPR *Pseudomonas*, в отличие от штаммов *P. putida*, которые, вероятно, являются более подходящими хозяевами для этих плазмид. Данная работа дает дополнительные сведения о характере наследования одной из самых разнообразных и биотехнологически значимой группы внехромосомных генетических элементов, а также указывает на необходимость поиска оптимальных бактериальных хозяев плазмид биодegradации ксенобиотиков при создании эффективных штаммов-деструкторов для использования в фиторемедиации.

Литература

1. Smalla K, Jechalke S, Top EM (2015) Plasmid detection, characterization and ecology. *Microbiol Spectr* 3(1). PLAS-0038-2014.
2. Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 63: 541–556.

3. Sevastyanovich YR, Krasowiak R, Bingle LEH, Haines AS, Sokolov SL, Kosheleva IA, Leuchuk AA, Titok MA, Smalla K, Thomas CM (2008) Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas*. *Microbiology*. 154: 2929–2941. DOI 10.1099/mic.0.2008/017939-0.

Гетерологичная экспрессия генов анаэробной метакрилатной редокс системы *Geobacter sulfurreducens* AM-1

Захарова М.В. *¹, Микулинская Г.В. **¹, Архипова О.В.*

* ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино; aroksan@gmail.com

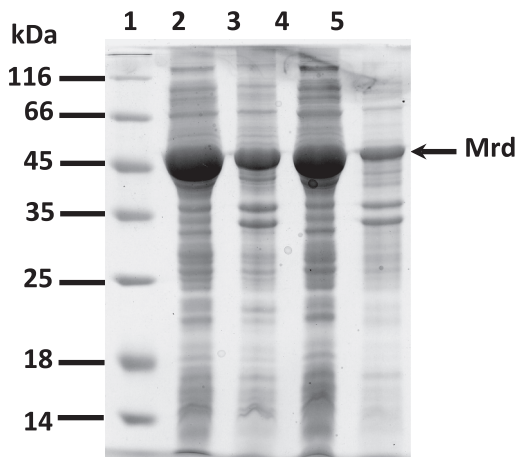
** ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. ак. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Пущино, ¹вклад авторов одинаков

Необычная метакрилатная редокс система *Geobacter sulfurreducens* AM-1 (класс *Deltaproteobacteria*) (Галушко и др., 1996; Arkhipova et al., 2015; Mikoulinskaia et al., 1999) использует метакрилат в качестве терминального акцептора восстановительных эквивалентов, трансформируя его в изобутират в периплазме бактерии. Эта ферментная система двух-компонентна и включает в себя флавинодержащую метакрилатредуктазу Mrd (50 кДа) и её физиологический донор электронов – цитохром *c* Mcc (30 кДа). Оба хромопротеида были нами ранее получены в чистом виде, охарактеризованы, их гены секвенированы (Arkhipova et al., 2015; Mikoulinskaia et al., 1999). Для дальнейшего исследования механизма катализа системой Mrd+Mcc, а также для возможного использования этих белков в целях биоремедиации отходов метакрилатных производств необходимо клонирование и экспрессия генов – либо гомологичная (в клетках типового штамма *G. sulfurreducens*), либо гетерологичная в клетках *E. coli*. Получить очищенные препараты рекомбинантных белков-компонентов метакрилатной редокс системы в случае успешного клонирования в клетки *E. coli* будет гораздо проще, чем из клеток *G. sulfurreducens* AM-1.

Целью нашей работы стало клонирование генов метакрилатредуктазы и цитохрома *c* бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 в клетки *E. coli* для получения штаммов-продуцентов компонентов этой метакрилатной редокс системы. Для успешной реализации поставленной цели необходимо было преодолеть ряд сложностей. Во-первых, оба компонента метакрилатной редокс системы имеют отщепляемые сигнальные пептиды разных типов (типа Tat у Mrd и типа Sec у Mcc), что свидетельствует о разных способах созревания белков. Во-вторых, успешное созревание цитохрома *c* подразумевает включение генов, которое в природе происходит в периплазме в анаэробных условиях.

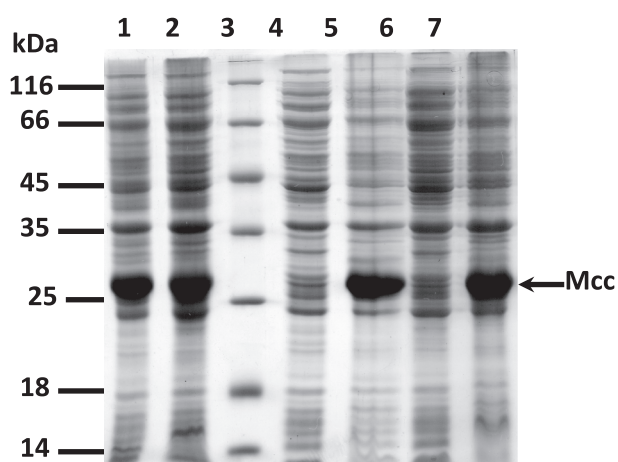
Клонирование гена метакрилатредуктазы с природной сигнальной последовательностью типа Tat и его дальнейшая экспрессия не привели к периплазматической локализации, целевой белок полностью оказался в телах включения. Следующим шагом явилось клонирование кодирующей последовательности зрелой части белка в модифицированный плазмидный вектор pQE30, лишенный His-taq. Экспрессия гена в штамме *E. coli* M15, содержащем плазмиду pREP4, индуцированная ИПТГ, привела к получению целевого продукта, частично растворимого, а частично локализованного в цитоплазме в виде тел включения. Проблему растворимости удалось решить с помощью низкотемпературной экспрессии: понижение температуры после индукции уже до 23°C привело к получению почти полностью растворимой цитоплазматической метакрилатредуктазы (рис. 1).

Рис. 1. Электрофореграмма белков клеточных фракций штамма *E.coli* M15(pREP4) – продуцента метакрилатредуктазы: 1- маркеры молекулярной массы, 2- клон 5, 20мкМ ИПТГ, супернатант, 3 - клон 5, 20мкМ ИПТГ, осадок, 4 - клон 6, 200 мкМ ИПТГ супернатант, 5 - клон 6, 200 мкМ ИПТГ, осадок.



Клонирование гена цитохрома *c* с природной сигнальной последовательностью типа *Sec* также не привело к успеху: продукт был гетерогенен по молекулярной массе, не имел периплазматической локализации и впридачу находился в цитоплазме в телах включения. Следующим шагом стало клонирование гена цитохрома *c* с отщепляемой сигнальной последовательностью *relB* в плазмиду pET22. Аэробная экспрессия в штаммах *E.coli* BL21(DE3) и C41(DE3) привела к получению продукта, молекулярная масса которого (25 кДа) свидетельствовала об отсутствии гемов. Поэтому мы экспрессировали целевой ген при пониженной

до 25°C температуре в штамме, содержащем вспомогательную плазмиду pEC86 (Arslan et al., 1998), несущую кластер генов *E.coli ccmABCDEFGHIH*, ответственных за созревание цитохромов *c* и в геноме экспрессирующихся в анаэробных условиях. Результатом явилась успешная продукция полноразмерного белка в аэробных условиях (рис. 2). Пока нерешенной проблемой остается локализация продукта в мембраносвязанной фракции. В дальнейшем мы планируем либо модифицировать условия выделения белка (значительно



увеличить концентрацию соли в буфере разрушения), либо удлинить линкер между сигнальной последовательностью и зрелым белком.

Рис. 2. Электрофореграмма белков клеточных фракций штамма *E.coli* BL21(pEC86) – продуцента цитохрома *c*: 1- клон 2, 200 мкМ ИПТГ, 2- клон 7, 20мкМ ИПТГ, 3- маркеры молекулярной массы, 4- клон 2, супернатант, 5 - клон 2, осадок, 6 - клон 7, супернатант, 7 - клон 7, осадок.

Таким образом, мы осуществили успешную гетерологичную экспрессию обоих компонентов уникальной метакрилатной редокс-системы анаэробной бактерии в аэробных условиях. В дальнейшем компоненты необычной ферментной системы, трансформирующей токсичное синтетическое органическое соединение метакрилат, содержащееся в отходах производств, будут получены в гомогенном виде и охарактеризованы, что позволит вовлечь их в очистку окружающей среды от токсических соединений и охрану здоровья человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-04-01068-а «Анаэробная ферментная система, восстанавливающая метакрилат».

Литература

1. Галушко А.С., Микулинская (Архипова) О.В., Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 495–498.
2. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. PLoS ONE. 2015. 10(5):e0125888. doi:10.1371/journal.pone.0125888

3. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R., Hedderich R. Eur J Biochem. 1999. V. 263. P. 346-352.
4. Arslan E, Schulz H, Zufferey R, Künzler P, Thöny-Meyer L. Biochem Biophys Res Commun. 1998. V. 251. № 3. P. 744-747.

Железовосстанавливающие экстремофильные прокариоты и их бактериальные спутники из холодных мест обитания

Захарюк А.Г., Щербакова В.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, г. Пущино; kuran82@mail.ru

На сегодняшний день микробиологами описан полный биогенный цикл железа, осуществляемый микроорганизмами разных физиологических и филогенетических групп. Наиболее полно этот цикл изучен в условиях нейтральных значений рН и нормальных температур. Изучению бактерий, восстанавливающих железо при низких температурах, уделено недостаточно внимания. Информация о физиологии и биохимии восстановления соединений Fe(III) психрофильными микроорганизмами ограничена единичными сообщениями. На современном этапе развития микробиологии, биотехнологии и нанотехнологии эти микроорганизмы привлекают наше внимание для решения таких теоретических и практических проблем, как создание микробных топливных элементов, электрон-проводящих цепей, происхождение и эволюция жизни на Земле.

Целью исследования было выявление процесса микробного восстановления Fe (III) в низкотемпературных пресных экосистемах, характеристика накопительных и чистых культур психрофильных и психроактивных железовосстанавливающих бактерий (ЖВБ), а также их бактериальных спутников.

Объектами исследования служили образцы донных осадков холодного минерального источника Буксыхен, расположенного в Северном Прибайкалье (Россия) и пробы низкотемпературных глубинных осадков озера Байкал, отобранных с глубины 409 м. Температура воды в исследуемых экосистемах независимо от сезона составляет от 3.5 до 7.5°C.

В результате длительной инкубации нами были получены три накопительные культуры психрофильных и психроактивных ЖВБ. Количество восстановленного железа в исследуемых накопительных культурах на 70 – 100 сутки культивирования при 7 и 15°C варьировало от 1.3 до 5.0 мМ. Во всех накопительных культурах наблюдался активный рост бактерий при низких температурах (увеличение биомассы в 5 – 10 раз), коррелирующий с накоплением Fe(II) в среде. Методом периодических пересевов накопительной культуры, полученной из донных отложений холодного минерального источника Буксыхен, на жидкую среду, содержащую нерастворимый оксид железа (III) в виде аморфной гидроокиси (10 мМ) и формиат натрия (20 мМ), была получена чистая культура психрофильных ЖВБ – штамм В-G1-3. Изолят представлял собой грамотрицательные неспорообразующие подвижные палочки. Штамм восстанавливал нерастворимый оксид железа при 7°C.

Из накопительной культуры ЖВБ, методом селективного посева с антибиотиками, был выделен психрофильный спутник - штамм SB-1, который в течение длительного времени пересевался и активно рос в смешанной культуре железоредукторов с цитратом Fe(III), инкубируемой при 7°C. Клетки штамма SB-1 представляли собой грамположительные кокки, часто соединенные в длинные цепочки. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что изолят относится к семейству *Carnobacteriaceae*. Ближайшими родственниками являлись *Trichococcus pasteurii* WN-1508^T и *Trichococcus collinsii* WN1503^T (92.9 и 92.0%, соответственно). Обе

бактерии аэротолерантные анаэробы, с бродильным типом метаболизма, в том числе с характерным ростом на малате, тартрате и цитрате (Liu et al., 2002).

Из отдельных колоний, полученных путем пересева накопительной культуры ЖВБ из осадков источника Буксыхен с цитратом Fe(III), на твердую анаэробную среду без источника железа был получен еще один бактериальный спутник – штамм SB-2. Колонии росли при 7°C. Морфологически штамм представлял собой подвижные Г(-) клетки сигмоидной формы. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК показал, что изолят кластеризуется с бактериями рода *Desulfovibrio*. На филогенетическом древе наиболее близкими к штамму оказались психротолерантные сульфатредукторы штамм КЗS^T (Рыжманова, 2015) и *D. ferrireducens* DSM 16995^T (Vandieken et al., 2006), выделенные из экосистем Арктики (99.8 и 98.2%, соответственно). Оба ближайших родственника способны восстанавливать цитрат Fe(III) без видимого роста.

Таким образом, нами было показано, что в исследуемых экстремальных местах обитания активно функционирует микробное сообщество, способное восстанавливать различные соединения трехвалентного железа при низких температурах. Выделен и частично охарактеризован штамм железовосстанавливающих бактерий В-G1-3, восстанавливающий при температуре 7°C до 50% нерастворимого оксида Fe(III) за 100 суток культивирования. Из накопительных культур ЖВБ, выращенных с цитратом Fe(III), выделены две бактерии – штаммы SB1 и SB2, которые, вероятно, принимают непосредственное участие в биогенном процессе восстановления железа в низкотемпературных экосистемах.

Литература

1. Liu J-R, Tanner R. S., Schumann P., Weiss N., McKenzie C. A., Janssen P. H., Seviour E. M., Lawson P. A., Allen T. D. and Seviour R. J. Emended description of the genus *Trichococcus*, description of *Trichococcus collinsii* sp. nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as *Trichococcus pasteurii* comb. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in the low-G+C Gram-positive bacteria // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. 52. 1113–1126.
2. Рыжманова Я.В. Новые экстремофильные анаэробные бактерии, восстанавливающие соединения серы и железа: Автореферат канд. биол. наук. - Пушино, 2015. - 22 с.
3. Vandieken V., Knoblauch C. and Jørgensen Bo B. *Desulfovibrio frigidus* sp. nov. and *Desulfovibrio ferrireducens* sp. nov., psychrotolerant bacteria isolated from Arctic fjord sediments (Svalbard) with the ability to reduce Fe(III) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. 56. 681–685.

Гомологи фаговых антигенов и фаговых полинуклеотидлигаз среди белков морской микробиоты

Зимин А.А.^{1*}, Назипова Н.Н.²

¹ ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушино

² ФГБУН Институт математических проблем биологии – филиал ИПМ им. М.В. Келдыша РАН; г. Москва; *apollo66@rambler.ru

Введение. Морские бактериофаги являются наиболее многочисленной и разнообразной формой реплицирующихся молекул ДНК на планете. На миллилитр океанской воды приходится $5 \cdot 10^7$ фагов. Морские бактериофаги составляют важную часть глубоководных экосистем [1]. На один квадратный метр глубоководного морского дна приходится от $5 \cdot 10^{12}$ до $1 \cdot 10^{13}$ фагов, а их численность связана с численностью прокариот

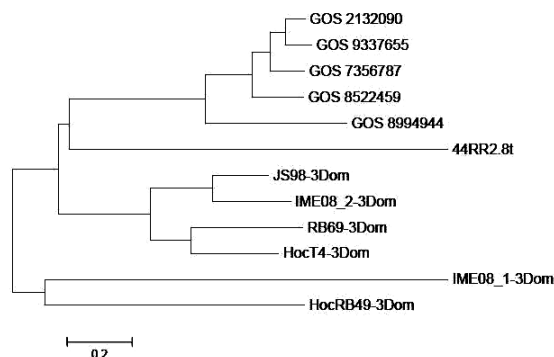
в донных отложениях. Они вызывают гибель почти 80% прокариот, обитающих в донных отложениях, и практически во всех случаях причиной гибели является лизис клеток. По этой причине бактериофаги играют важную роль в переводе питательных веществ из живущих организмов в разложенное органическое. Это объясняет высокий оборот питательных веществ на дне океана. Высвобождение питательных веществ из инфицированных бактерий вызывает рост неинфицированных бактерий, которые потом также становятся заражёнными бактериофагом. Морские бактериофаги влияют на круговороты углерода, азота и фосфора. Биоразнообразие бактериофагов океана пока еще недостаточно охарактеризовано. Одной из больших баз метагеномных данных, полученных при исследовании проб морской планктонической микробиоты, является база Института Крега Вентера (США) - БДКВ. Пробы были получены на протяжении нескольких тысяч километров, с обеих сторон Панамского канала из двух океанов. Было просеквенировано 6.3 млрд. пар оснований, которые были транслированы в более чем 6 млн. аминокислотных (а.к.) последовательностей. Как наиболее часто встречающиеся, отмечены геномы пяти родов бактерий *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Pelagibacter*, *Shewanella*, и *Burkholderia*. При этом три рода *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, и *Pelagibacter* представлены в более чем в 17% а.к. последовательностей. Метагеномные исследования К.Вентера и его коллег расширили наши знания о белках морских бактериофагов. С этой точки зрения весьма интересен поиск гомологов фаговых белков в этой БД. Данная работа посвящена поиску в БДКВ и анализу последовательностей, гомологичных полинуклеотидлигазам фагового происхождения, и антигенов фагов.

Методы исследования. Было проведено сравнение ДНК-лигазы, РНК-лигазы I, РНК-лигазы II и Нос-белка фага T4 (*Myoviridae*) с транслированными с использованием генетического кода бактерий, архей и растительных пластид метагеномными данными БДКВ. Для этой цели использовалась программа PSI-BLAST [2,3], позиционный итерационный поиск аналогов производился до тех пор, пока каждая последующая итерация обнаруживала в GenBank новые локальные сходства при уровне значимости $E < 10^{-4}$. На основе полученных данных был осуществлен филогенетический анализ отдельных белков [4]. Для этого были проведены множественные выравнивания последовательностей с помощью программы ClustalX [5]. Построение филогенетических деревьев проводили с помощью пакета программ Mega4 [6].

Исследование БДКВ на наличие последовательностей, гомологичных полинуклеотидлигазам фагов. Поиск гомологов ДНК-лигазы фага T4 в БДКВ обнаружил более 100 новых последовательностей. Аналогично для белка репликативной машины фага T4, продукта гена 45, найдено 100 гомологов, что является дополнительным доказательством реалистичности результата. Высокую степень достоверности сходства показали 4 полноразмерных белка, содержащие как пептиды центра активности, так и ДНК-связывающего домена, АТФ-зависимых ДНК-лигаз. У трех из этих последовательностей (GOS_8091646, GOS_8450726, GOS_8453156) с помощью программы BLASTp было обнаружено сходство с фаговыми ДНК-лигазами ряда бактериофагов вибрионов, энтеробактерий и бацилл. Аналогичный анализ для РНК-лигазы II фага T4 обнаружил в океанической базе данных лишь 3 гомолога. Вероятно, что функция РНК-лигазы II фага T4 не характерна для океанического сообщества. В отличие от нее гомологи последовательности РНК-лигазы I фага T4 встречаются в океаническом планктоне значительно чаще (22 совпадения). При этом у трех последовательностей (GOS_1674719, GOS_9551053, GOS_7774052) с помощью обратного сравнения с базами данных найдены сходства с РНК-лигазами II ряда T4-подобных бактериофагов. Такие белки, как и гомологи ДНК-лигазы, могут принадлежать крупным фагам, которые еще не выделены микробиологическими методами. Сравнение ДНК-лигазы фага T7 (семейство *Podoviridae*) обнаруживает лишь 2 сходные последовательности в исследованных метагеномных данных БДКВ, что может свидетельствовать о том, что эта лигаза, как и РНК-лигаза II, не присутствует в представителях океанической биоты.

Поиск гомологов белка Нос в БДКВ. Поиск обнаружил более 140 последовательностей, проявляющих достоверное сходство с антигеном бактериофага Т4. При этом не было найдено последовательностей, сходных с соответствующим белком бактериофага RB49. Более подробный анализ показал, что геномы морских бактериофагов не содержат последовательностей, гомологичных консервативным пептидам этого белка и, скорее, не принадлежат фагам Т4-типа. Дендрограмма, построенная по аминокислотным последовательностям морских иммуноглобулинподобных белков и антигенов различных Т4-подобных фагов приведена на рис. 1.

Рис. 1. Филогенетическое дерево для пяти белков и антигенов Т4-фагов: 44RR2.8t, JS98, IME08_2, RB69, НосТ4, IME08_1, НосRB49. Кладистический анализ был проведен с помощью метода Neighbor-Joining [4]. Эволюционные расстояния были рассчитаны, и построение дерева было проведено с помощью пакета программ MEGA4 [6]. Сумма длин ветвей дерева составляет 6,61991103 ед. Масштаб указан в процентах отличий.



Заключение. Проведенный анализ позволяет предположить наличие в океанической биоте новых крупных бактериофагов отряда Caudovirales, геномы которых кодируют последовательности полинуклеотидлигаз. Скорее всего, найденные последовательности не принадлежат к фагам Т4-типа, что еще более интересно, т.к. фаги Т4-типа давно обнаружены в океане. Сходные с белком Нос последовательности, найденные в БДКВ, вероятно, принадлежат не фагам, а каким-то океаническим бактериям, так как содержат существенное доменное различие с антигеном фага Т4. Работа была частично поддержана грантами РФФИ №15-07-05783 и №16-44-230855.

Литература

1. Danovaro R., Dell'Anno A. et al. *Nature*. 2008, 454, 1084–1087.
2. Altschul S.F., Madden T.L. et al. *Nucleic Acids Res.* 1997, 25, 3389–3402.
3. Blast Tool. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (дата обращения 03.11.2017).
4. Jeanmougin F., Thompson J.D. et al. *Trends Biochem. Sci.* 1998, 23, 403–405.
5. Tamura K., Dudley J. et al. *Mol. Biol. Evol.* 2007, 24, 1596–1599.
6. Saitou N. and Nei M. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406–425.

Бактериофаги *P.aeruginosa* из ЖКТ зубров и бизонов: первичный анализ

**Зимин А. А.^{1,2}, Сузина Н.Е.¹, Никулин Н.А.^{1,3}, Кононенко С.И.⁴, Землянко И.И.⁵,
Скобляков Н.Э.⁴**

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

²ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт»

³ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», г. Киров

⁴Краснодарский научный центр по ветеринарии и животноводству, г. Краснодар

⁵Приокско-Тerrasный государственный заповедник им. М.А. Заблoцкого,
пос. Данки, Моск. обл.

Аннотация. Бактериофаги псевдомонад были обнаружены у зубров – животных, родственных крупному рогатому скоту, обитающих в Центральном зубровом питомнике Приокско-Тerrasного заповедника. Методом трансмиссионной электронной микроскопии

были идентифицированы фаги *P.aeruginosa* морфотипов A1, A2 и F1. Отмечается возможная связь обнаружения этих фагов с диареей одного из молодых животных.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-44-230855-р_а.

P.aeruginosa не считается нормальным обитателем кишечного тракта у КРС, тем не менее, давно уже известно о его размножении в ЖКТ КРС в связи с различными инфекциями при дисбиозе. Чаще всего *P.aeruginosa* ассоциирована с бактериальными инфекциями при мастите вымени коров. Основным возбудителем этой инфекции являются стафилококки, а *P.aeruginosa* может быть одним из дополнительных возбудителей [Hoadley & McCoy, 1968]. Подробное изучение литературы демонстрирует необходимость получения дополнительной информации об ассоциациях *P.aeruginosa* у крупных полигастричных животных. В некоторых стадах коров достаточно часто сталкивались с инфекциями, вызванными *P.aeruginosa* [Carroll et al, 1973, 1974]. Использование в качестве модельного объекта для этой цели европейского зубра весьма интересно тем, что данное животное обитает не в условиях фермы, а в лесу. *P.aeruginosa* – это микроорганизм, часто встречающийся в почве и природных водоемах. Попадание его в корм как животных выращиваемых на ферме, так в особенности животных полувольного обитания в вольерах большой площади, таких как зубры Центрального зубрового питомника ПТГЗ им.М.А.Заблоцкого весьма вероятно.

Методика. Материалом для исследования послужили пробы фекалий зубров (*Bison bonasus*) и бизонов (*Bison bison*). Отбор проводился из различных мест обитания, включая загон для ослабленного молодняка, стандартный загон для содержания мини стад, и загон для содержания стада подросших животных. Отбор проб фекалий производили 20 июля 2016 года с 12-00 до 14-00. Были отобраны следующие пробы: 2 пробы фекалий у молодой самки и молодого самца зубра, у которых была диарея после рождения; старые (несколько часов) фекалии молодого самца зубра; свежие фекалии молодого самца зубра; свежие фекалии взрослого самца бизона. В тот же день производили получение фаговых экстрактов. Получение фаговых экстрактов. 2 г фекалий суспендировали в 8 мл фагового буфера. Далее перемешивали в орбитальном шейкере в течение 20 минут при 100 об/мин 22°C, разливали по 5 мл. Центрифугировали 2 мин., 10000 об/мин, и супернатант использовали сразу о после получения. Высев на штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 проводили также после 3 месяцев хранения при -70°C. Для хранения, добавляли глицерин до 50% (об/об) и хранили при -20°C. Высев фагов на штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 делали методом Грациа. Использовали среду LB. Очистку фаголизатов от бактерий проводили путем фильтрации через фильтры фирмы Millipore с отверстиями 0.22 мкм. Концентрирование фаговых лизатов проводили в микроцентрифуге с использованием центрифужных насадок Vivaspin 500 (VS0151) с мембранами 300.000 MWCO PES. Препараты фагов для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) контрастировали 1% раствором уранилацетата.

Результаты исследований. В большинстве проб титр фагов на штамме *P. aeruginosa* PAO1 был от 15 до 120 бляшек на г фекалий, лишь в пробе, отобранной из загона для ослабленного молодняка, переболевшего диареей, титр составлял 10² БОЕ/г.

Исследование морфологии фагов. Все эти бактериофаги могут быть отнесены к морфотипу A1 семейства *Myoviridae*, отряда *Caudovirales*. Скорее всего, они относятся к двум видам фагов: один вид — это бактериофаг 2A1 и другой бактериофаг — это частицы 2A2 и 2A3. При этом у частицы 2A3 сокращен чехол отростка. На это указывают проведенные нами измерения размеров частиц. Так головка частицы бактериофага 2A1 имеет длину 87.2 – 89.7 нм и ширину 82 нм, головка бактериофага 2A2 имеет длину 89.7 – 92.3 нм и ширину 87.1 нм, а головка бактериофага 2A3 имеет длину 89. нм и ширину 7 82.0 – 84.6 нм. Это изометрические головки, что и позволяет отнести эти бактериофаги к морфотипу A1. Они близки по размеру, и можно предположить, что небольшая разница в размерах связана с ошибкой измерений, вызванной методами исследования (высушиванием сеточки с образцом перед ТЭМ). Однако, различие в размерах отростков было существенное.

На ТЭМ снимках были обнаружены также вирусоподобные частицы, по морфологии сходные с бактериофагами семейства *Inoviridae* морфотипа F1. Длина частиц составляла около 1100 нм и толщина около 17 нм. Было видно различное устройство концов частиц. У нитчатых бактериофагов кишечной палочки группы f1, таких как f1, fd и m13, концы частиц также различаются по строению. Один конец состоит из 3 – 5 копий белка 3 и 3 – 5 копий белка 6, другой конец составлен несколькими копиями белков 7 и 9. У обнаруженных нами частиц условно "передний" конец представляет собой заостренную головку, а условно "задний" конец немного расширен и схож с базальной пластинкой фагов диаметром 20 – 23 нм. Бактериофаги группы f1 широко применяются для фагового дисплея. На основе дисплея на новых нитчатых бактериофагах молекулярных "флагов" в настоящее время предложен метод получения тест систем для экспресс-определения штаммов хозяев таких бактериофагов в пробах из природы. Открытые в этом исследовании нитчатые фаги также могут быть применены для выявления патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

Выводы. (1) Нами были определены титры фагов из фекалий зубров и бизонов на штамме *P. aeruginosa* PAO1. (2) Показано с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, что биоразнообразие бактериофагов псевдомонад в фекалиях зубра весьма ограничено. Обнаружены лишь представители семейств *Myoviridae* и *Inoviridae* морфотипов A1, A2 и F1.

Литература

1. Hoadley AW, McCoy E. Some observations on the ecology of *Pseudomonas aeruginosa* and its occurrence in the intestinal tracts of animals. *Cornell Vet.* 1968 Jul;58(3):354-63. PubMed PMID: 4968352.
2. Carroll EJ, Lasmanis J, Jain NC, Schalm OW. Use of dimethyl sulfoxide-flumethasone combination for treatment of endotoxin-induced bovine mastitis. *Am J Vet Res.* 1974 Jun;35(6):781-5. PubMed PMID: 4599944.
3. Carroll EJ, Jain NC, Schalm OW, Lasmanis J. Experimentally induced coliform mastitis: inoculation of udders with serum-sensitive and serum-resistant organisms. *Am J Vet Res.* 1973 Sep;34(9):1143-6. PubMed PMID: 4583644.

Вирусоподобная частица с признаками фага из семейства *Tectiviridae* в лизате протей

Зимин А.А.^{1,2}, Чугунова Е.О.³, Сузина Н.Е.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, г. Пущино

²ФГБОУ ВО «Пущинский естественно-научный институт»

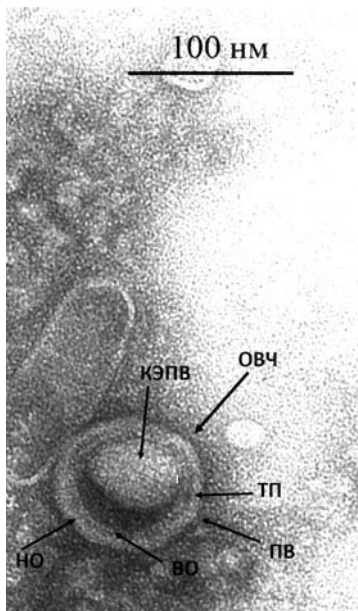
³ФГБОУ ВО «Пермский государственный аграрно-технологический университет», г. Пермь

Аннотация. При морфологическом анализе объектов на электронно-микроскопических снимках лизатов протей при контрастировании уранилацетатом была обнаружена вирусоподобная частица с признаками бактериофага семейства *Tectiviridae*. Это были следующие признаки: (1) покров частицы состоял из двух слоев, (2) один из слоев был образован твердой оболочкой, имеющей гексогональную форму, (3) другой слой по строению соответствовал двуслойной липидной мембране, (4) размеры частицы были лишь на 7% больше изученных к настоящему времени бактериофагов семейства Тективириды, (5) частица имела хорошо различимое отверстие на одной из вершин икосаэдра, (6) данное отверстие было заткнуто пробкой конической формы, (7) внутри частицы находился сжатый от высыхания комочек электронно-прозрачного вещества, занимавший около половины внутреннего объема частицы, что соответствует короткому геному фагов семейства Тективириды. Таким образом, можно предположить, что нами наблюдался впервые

бактериофаг протей из данного семейства. Данное явление требует дополнительных исследований для подтверждения находки, в том числе получения гомогенного препарата данного бактериовируса и секвенирования его генома.

Материалы и методы. Для получения фагов использовали референтные и полевые штаммы протей (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*), полученные из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России и выделенные из мясных продуктов, а также из трупов животных. Материалом для исследований служили бактериофаги, собранные из патологического материала от зараженных протеем мышей. Работа по выделению бактериофагов проведена в ГБУВК «Пермский ветеринарный диагностический центр» г. Пермь в период 2014-15 гг. Электронная микроскопия выполнена в ИБФМ РАН в 2016 г., анализ проведен в ИБФМ РАН в 2017 году.

Результаты. Анализируя результаты ТЭМ мы пришли к выводу, что изучаемые лизаты содержали ряд бактериофагов отряда *Caudovirales*, в том числе вирионы по морфологическим свойствам характерные для фагов семейства *Myoviridae* и *Siphoviridae*. Одна из частиц заинтересовала нас более. Эта частица не имела хвоста и производила впечатление головки фага с отломанным в процессе манипуляций хвостом. Такое постоянно встречается при работе с первичными лизатами. То есть на одном из ТЭМ-снимков была обнаружена округлая вирусоподобная частица довольно большого размера. Ее длина была 87,5 нм и ширина 80 нм. Частица имела толстую двойную оболочку толщиной - 12,5 нм. При этом толщина внешнего покрова составляла 7,5 нм, а толщина внутреннего покрова - 5 нм. Внутренний покров также в ряде мест можно было разделить на два слоя. Внешние покровы были разделены тонким промежутком. Можно однозначно сказать, что в форме частицы просматривается полигональность. Можно предположить, что эта частица по



форме представляет собой слегка вытянутый икосаэдр. Одна из вершин этого икосаэдра выглядит как отверстие, заткнутое подобием пробки, в форме усеченного конуса. Внутренняя камера частицы также имеет признаки полигональности. Внутренняя камера содержит комок электронно-прозрачного вещества, занимающего примерно 2/3 камеры. Исходя из структуры частицы, можно предположить, что это частица вируса из семейства *Tectiviridae*. Вершина с отверстием у *Tectiviridae* при этом называется порталной вершиной. В этом случае отверстие в одной из вершин может служить для выпуска ДНК из частицы. Геномы изученных фагов из этого семейства имеют достаточно короткий геном (около 15 тысяч пар нуклеотидов). Это свойство также соответствует увиденному. Комок электронно-прозрачного вещества мог быть образован высыханием нуклеоида небольшого размера при приготовлении препарата для ТЭМ. Данное явление также часто встречается при приготовлении препаратов фагов.

Рис. 1. Округлая вирусоподобная частица в лизатах протей.

Наблюдаемая частица - это, вероятно бактериофаг из семейства *Tectiviridae*. Обозначения на рисунке **ОВЧ** - округлая вирусоподобная частица, **НО** - наружная оболочка, **ВО** - внутренняя оболочка, **ТП** - тонкий промежуток между оболочками, **ПВ** - предполагаемая порталная вершина частицы, заткнутая белковой «пробкой», **КЭПВ** - комок электронно-прозрачного вещества внутри камеры частицы. Увеличение X 50000. Масштабная линейка 100 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом.

Наиболее близким по строению вирусом к фагам семейства Тективириды являются аденовирусы человека. Оба вируса также имеют общую архитектуру с идентичными капсидными решетками и характерными крепежными белками на своих вершинах. Хотя эти два вируса, соержащие дцДНК, заражают хозяев из самых разных филл, их сходства паразительны. Эти данные указывают на их определенные эволюционные отношения.

Они имеют два слоя оболочки: верхний твердый белковый и внутренний - липидную мембрану, имеют достаточно короткий геном. Более того, молекула основного белка тективируса PRD1 - P3 - по своей структуре очень похожа на гексон, эквивалентный белок в частице аденовируса человека (3). Они имеют лишь одно принципиальное различие: у аденовирусов нет отверстия в одной из вершин, которое хорошо видно в составе частицы, обнаруженной нами. Это также подтверждает находку нами частицы крупнейшего на сегодняшний день тективируса. PRD1 имеет очень широкий круг хозяев среди энтеробактерий и находка у протей тективируса не является чем-то исключительным, хотя ранее таких наблюдений не было.

Литература

1. San Martín, C; Huiskonen, JT; Bamford, JK; Butcher, SJ; Fuller, SD; Bamford, DH; Burnett, RM(2002). "Minor proteins, mobile arms and membrane-capsid interactions in the bacteriophage PRD1 "Minor proteins, mobile arms and membrane-capsid interactions in the bacteriophage PRD1 capsid". Nature Structural Biology. 9 (10): 756–63. doi:10.1038/nsb837. PMID 12219080.
2. Saren, AM; Ravanti, JJ.; Benson, SD.; Burnett, RM.; Paulin, L; Bamford, DH.; Bamford, J. K. H. (2005). "A Snapshot of Viral Evolution from Genome Analysis of the Tectiviridae Family". Journal "A Snapshot of Viral Evolution from Genome Analysis of the Tectiviridae Family". Journal of Molecular Biology. 350 (3): 427–440. doi:10.1016/j.jmb.2005.04.059.
4. Viral Evolution Revealed by Bacteriophage PRD1 and Human Adenovirus Coat Protein Structures SD Benson, JK.H Bamford, DH Bamford, RM Burnett, Cell, Volume 98, Issue 6, p825–833, 17 September 1999

NCRII-18: эволюционный интермедиат эндонуклеазы рестрикции EcoRII типа II

Ибряшкина Е.М., Солонин А.С., Захарова М.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
г. Пущино; ibryashkinae@rambler.ru

Ферменты СРМ типа II обнаруживают высокое разнообразие их структурной и доменной организации, молекулярных механизмов ДНК-взаимодействий и эволюционных взаимосвязей между разными группами ферментов.

Гены ферментов рестрикции, подобно транспозонам и вирусам, рассматриваются как самостоятельные мобильные генетические элементы, которые могут выступать в роли модуляторов генетической изменчивости бактерий, обеспечивая как свое распространение и поддержание в клетках, так и бактериальное биоразнообразие.

Основываясь на этой гипотезе можно предположить, что потребность ряда ферментов рестрикции в специфическом взаимодействии с большим количеством последовательностей узнавания возникла в результате необходимости обеспечить большую мобильность собственных генов, за счет ограничения возможности атаки бактериального генома нового хозяина.

Приобретение белками новых структурных доменов могло произойти либо в процессе генетических перестроек при горизонтальном переносе их генов, либо в результате встраивания фрагментированной чужеродной ДНК в геном. Подобные изменения, вероятно, избирательно накапливались в ходе эволюции и привели к возникновению новых белков с новыми функциями.

Эндонуклеазы рестрикции EcoRII и Ecl18kI являются эволюционно родственными ферментами, имеют сходный мотив каталитического сайта 159VDX21KX12E и специфически взаимодействуют с CC:GG парами их схожих последовательностей

узнавания 5'-CCWGG (W – А или Т) и 5'-CCNGG-3' (N – А,Т,Г или С) соответственно. Отличие этих эндонуклеаз проявляется в их доменной организации и, как следствие, в разнице механизмов взаимодействия ферментов с субстратом. Ecl18kI не имеет доменов, специфически взаимодействуя с одной копией ДНК, фермент гидролизует обе цепи сайта узнавания. В структуре EcoRII обнаружено два домена: каталитический С-домен и ДНК-связывающий N-домен. С-концевой домен был охарактеризован как самостоятельная эндонуклеаза рестрикции EcoRII-C, которая подобно ферментам подтипа II, гидролизует единичный сайт на ДНК. Присутствие N-концевого домена в полноразмерном ферменте EcoRII приводит к ослаблению активности EcoRII-C и обуславливает зависимость фермента от наличия дополнительного эффекторного сайта связывания, исполняя роль регулятора каталитической активности в системе EcoRII.

В связи с тем, что большинство ЭР типа II не содержит дополнительного N-концевого домена, можно предположить, что предок современной эндонуклеазы рестрикции EcoRII приобрел N-концевой домен в процессе эволюции в результате генетических преобразований. Структурные изменения обеспечили свойство EcoRII взаимодействовать с двумя сайтами узнавания на ДНК, и таким образом способность ограничивать атаку субстратной ДНК, делать ее более избирательной.

Возможность существования такого рода промежуточных форм эволюции ферментов рестрикции и доказательства влияния N-концевого домена на функциональную активность фермента, изменение специфичности связывания и его каталитических свойств, стало целью настоящего исследования. Впервые была получена плазмидная конструкция для экспрессии фьюжн белка NCR11-18 на базе гена эндонуклеазы Ecl18kI с пришивкой части гена, кодирующего N-концевой домен EcoRII. Впервые созданы уникальные жизнеспособные штаммы *E.coli*, продуцирующие фьюжн белок NCR11-18, оптимизирована методика индукции гибридного гена в штаммах-продуцентах. Впервые выделен фьюжн белок NCR11-18 методом аффинной хроматографии и методом Western blot доказано соответствие полученного рекомбинантного белка с теоретически рассчитанным (Рис.1).

В экспериментах *in vivo* по ограничению роста модифицированного и немодифицированного фага лямбда на штамме-продуценте NCR11-18 в присутствии/отсутствии индуктора и анализе *in vitro* гидролитической активности в бесклеточном экстракте и на субстратах ДНК pUC18, ДНК фага PhiX174, доказана работоспособность полученного фьюжн белка наличием каталитической эндонуклеазной активности. Установлено, что пришивка N-концевого домена, изменяя доменную структуру белка, но не влияет на проявление специфичности связывания ДНК, ослабляя при этом каталитические свойства гибридного фермента, как и в случае с эндонуклеазой EcoRII-C.

Белок	Специфический субстрат с одним сайтом узнавания CCAGG			Специфический субстрат с двумя сайтами узнавания CCAGG		
	K_d , нМ	χ^2	R^2	K_d , нМ	χ^2	R^2
NCR11-18	84.27±14	54	0.91	47.95±8	43	0.9
EcoRII	15.5±3	52	0.89	9.4±2	73	0.89
StyD4I	163.1±54	43	0.82	168.2±36	37	0.9

Табл. 1. ДНК-связывающая активность фьюжн белка NCR11-18 на специфическом субстрате (10 нМ)

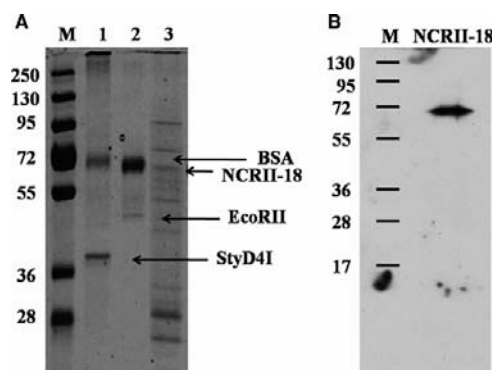


Рис.1. (А) Электрофоретическое разделение белков в денатурирующем 9% ПААГ. М, маркер; 1, StyD4I; 2, EcoRII; 3, NCR11-18; (Б) Анализ Western blot белковой фракции с фьюжн белком NCR11-18. М, маркер

Анализ специфического узнавания ДНК фьюжн белком NCR118 методом задержки ДНК-белковых комплексов в геле и вычисление констант диссоциации фьюжн белка NCR118 (Табл.1), позволили определить, что эндонуклеаза NCR118 обладает специфичностью связывания последовательности узнавания 5'-CC(W)GG-3', характерной для ферментов Ecl18kI и EcoRII, с формированием на ней единственного специфического комплекса. Однако пришивка N-домена привела к дискриминации фьюжн белком 5'-CC(S)GG-3' сайтов узнавания, характерных для Ecl18kI. Структурные изменения фьюжн белка привели к изменению механизма его специфического узнавания ДНК, NCR118 связывает субстрат с двумя сайтами с большей аффинностью, чем с одним сайтом, подобно EcoRII.

Таким образом, N-домен EcoRII способен изменять каталитические и ДНК-связывающие свойства фермента и является важным структурным эволюционным элементом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №14-04-32020 «мол_а». Результаты исследования опубликованы в виде научной статьи в журнале *FEBS Letters* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28486766>).

Анализ генов деградации алифатических и ароматических углеводов нефти у микроорганизмов-деструкторов Финского залива

Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
г. Пущино; tatiz@ibpm.pushchino.ru

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами в настоящее время является основной угрозой для морских экосистем. Внутриматериковое Балтийское море, береговая линия которого поделена между девятью промышленно развитыми странами, особо уязвимо. Бактерии быстро приспосабливаются к наличию в среде чужеродных соединений, в частности, углеводов нефти, которые включают алифатические, разветвленные и циклоалифатические алканы, а также ароматические моно- и полициклические углеводороды. Однако, в отличие от почвенных деструкторов, утилизирующих широкий класс субстратов, морские микроорганизмы обычно узкоспециализированы. Таким образом, для биоремедиации сложного комплекса углеводов нефти, необходимо совместное участие микроорганизмов, обладающих различными генетическими системами катаболизма углеводов. Изучение биодеградативного потенциала микробных сообществ Балтийского моря является основой перспективного использования данных микроорганизмов для ускорения процессов биоремедиации.

В работе исследовано родовое и генетическое разнообразие штаммов микроорганизмов – нефтедеструкторов, изолированных из проб морской воды и донных отложений из двух точек Финского залива Балтийского моря (порта Усть-Луга и д. Кандикюля) в зимний (78 образцов) и летний периоды (95 образцов). Более 50 % всех изолированных микроорганизмов способны к росту на толуоле, около 45 % – на нафталине и около 35 % штаммов используют нефть, дизельное топливо и/или фенантрен в качестве единственного источника углерода и энергии. Всего было идентифицировано 32 рода микроорганизмов, относящиеся к типам *Proteobacteria* (альфа-, бета- и гамма-протеобактерии), *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Обнаружена сезонная изменчивость микробных сообществ нефтедеструкторов: в зимний период преобладают гамма-протеобактерии (*Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp. и *Acinetobacter* sp.), тогда как в летних пробах наибольшее разнообразие родов наблюдается у актинобактерий с преобладанием *Rhodococcus* sp. Появление штаммов *Rhizobium* и *Burkholderia* в летний период указывает на влияние почвенных и пресноводных сообществ нефтедеструкторов. Кроме того, эвтрофикация обуславливает наличие фирмикутов в летних пробах. Штаммы

Ochrobactrum, *Rahnella* и ряд других присутствуют только в пробах донных отложений, другие, например, *Delftia* - исключительно в пробах морской воды.

Исследуемые микроорганизмы тестировали на наличие известных последовательностей генов деградации алифатических и ароматических углеводородов нефти. Последовательность гена алкан-гидроксилазы, *alkB*, которая служит маркером для определения биоремедиационного потенциала, наблюдалась в 27-и образцах, что составляет около 16% от всех исследованных штаммов и согласуется с данными, полученными для других участков Балтийского моря. Последовательность гена фенантрен 3,4 - диоксигеназы, *phnAc*, обнаружена в зимних и летних пробах у штаммов *Sphingobacterium* sp. и *Arthrobacter* sp. Классические опероны деградации нафталина (*nah*) у пяти штаммов *Pseudomonas* sp. из зимних образцов локализованы в составе катаболических плазмид, три из которых принадлежат к IncP-9, одна – IncP-7 и одна неизвестной группы несовместимости (Табл.1).

Табл. 1. Результаты анализа штаммов-нефтедеструкторов *Pseudomonas* sp. на наличие плазмид.

Штамм	Фенотип	Генотип	Наличие плазмиды	IncP
<i>Pseudomonas</i> sp. KNAH1	Nah	<i>nahAc nahG nahH</i>	+	P-9
<i>Pseudomonas</i> sp. KwDis2	Nah Tol	<i>nahAc nahG nahH alkB</i>	+	
<i>Pseudomonas</i> sp. KwNAH1	Nah	<i>nahAc nahG nahH</i>	+	P-9
<i>Pseudomonas</i> sp. ULOil1	Oil Dis Nah Phn Tol	<i>nahH</i>	+	
<i>Pseudomonas</i> sp. ULNAH1	Nah	<i>nahAc nahG nahH</i>	+	P-9
<i>Pseudomonas</i> sp. ULwOil1	Oil Tol	<i>nahH</i>	–	
<i>Pseudomonas</i> sp. ULwOil3	Tol	<i>nahH</i>	–	
<i>Pseudomonas</i> sp. ULwNAH1	Nah	<i>nahAc nahG nahH alkB</i>	+	P-7

Обозначения: K – место отбора проб возле поселка Кандикюля; UL – место отбора проб возле порта Усть-Луги; w – пробы морской воды; Oil – нефть; Dis – дизельное топливо; NAH – нафталин; Phn – фенантрен; *nahAc*– наличие гена нафталин 1,2-диоксигеназа, *nahG* - наличие гена салицилат 1-монооксигеназа, *nahH* - наличие гена катехол-2,3-диоксигеназы, *alkB* -наличие гена алкан-гидроксилазы, IncP – группа несовместимости.

Опероны деградации нафталина через салицилат и гентизат присутствуют у штаммов *Burkholderia* и *Delftia*. RLFP – анализ позволил предположить близость данных последовательностей штаммов *Burkholderia* и *Delftia nag* – генам штамма *Ralstonia* sp. U2, причём для штаммов *Delftia* sp. наличие *nag*-генов показано впервые. Последовательности гена салицилат 5-гидроксилазы, *nagG*, также содержат штаммы *Achromobacter*, *Sphingobacterium* и *Stenotrophomonas*.

Были определены нуклеотидные последовательности ампликонов гена *nagG* штаммов *Burkholderia* sp. ULPhn1 (MF477854), *Delftia* sp. ULwDis3 (MF477855), *Achromobacter* sp. KOil1 (MF477851), *Sphingobacterium* sp. KPhn1 (MF477852) и *Stenotrophomonas* sp. ULDis1 (MF477853), а также ампликона гена *nahAc* штамма *Burkholderia* sp. ULPhn1 (MF498777). Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что основная роль в утилизации ароматических углеводородов штаммом *Burkholderia* sp. ULPhn1, как и штаммами *Delftia* spp., принадлежит *nag*-подобным генам.

Филогенетический анализ показал, что салицилат 5-гидроксилазы (NagG) штаммов-нефтедеструкторов Балтийского моря относятся к трём различным подгруппам, которые можно условно выделить как подгруппа *Variovorax*, подгруппа *Achromobacter* и подгруппа *Burkholderia*. Присутствие в одной подгруппе салицилат 5-гидроксилаз представителей протеобактерий и *Bacteroidetes* (*Sphingobacterium* sp. KPhn1) служит подтверждением горизонтального переноса *nag*-генов между разными типами бактерий, встречающимися в Балтийском море.

Данная работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта – RFMEFI61615X0038.

Новые бактериофаги инфицирующие бактерии группы *Bacillus cereus*

Казанцева О.А.¹, Загородный В.А.², Кулябин В.А.³, Пилигримова Э.Г.^{1,4}, Солонин А.С.^{1,5},
Шадрин А.М.^{1,5}

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; andrey2010s@gmail.com

²ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет
им. С.П. Королева»

³ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск

⁴ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», г. Киров

⁵ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»

Бактериофаги – одна из самых распространенных форм жизни на Земле. Биоразнообразие бактериофагов оценивается 100 млн. различных видов или 10^{30} - 10^{32} частиц (Sulakvelidze, 2013). К бактериям группы *Bacillus cereus* относят виды: *B. cereus*, вызывающий пищевые отравления; *B. thuringiensis*, использующийся как биоинсектицид; а также *B. anthracis*, вызывающий сибирскую язву. Бактерии группы *B. cereus* способны к росту в пищевых продуктах при низких температурах, а поскольку эти почвенные бактерии повсеместно распространены, они являются одним из наиболее часто встречающихся этиологических агентов, вызывающих пищевые отравления (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; European Food Safety Authority, 2015). Впервые наблюдение лизиса *B. anthracis*, опосредованного бактериофагами, было задокументировано в 1898 году Николаем Федоровичем Гамалеей, выдающимся русским ученым-микробиологом (Bardell, 1982), еще до открытия и появления термина «бактериофаги», введенного Д'Эреллем в 1917 году (D'Herelle, 1917).

В середине 2000-х годов вновь возрос интерес к бактериофагам, инфицирующим микроорганизмы рода *Bacillus*, который был обусловлен появлением новых методов секвенирования геномов, а также возможностью применения бактериофагов и их компонентов в медицинской диагностике, разработке новых противобактериальных средств и пищевой микробиологии.

Бактериофаги и их белки – факторы адсорбции, нашли применение в быстрой идентификации некоторых бактерий. Например, генетически модифицированный бактериофаг «гамма», с встроенной последовательностью оперона *luxAB*, позволяет детектировать *B. anthracis* за несколько минут, за счет биолюминесценции (Schofield *et al.*, 2011).

Препараты на основе бактериофагов с успехом применяются как для борьбы с внутрибольничными инфекциями, так и в качестве превентивных мер для предотвращения эпидемий на территории России. На последних стадиях заражения бактерий, бактериофаги разрушают клеточную стенку хозяина с помощью ферментов – эндолизинов. Эндолизины бактериофагов было предложено использовать как новые противобактериальные средства (Schuch *et al.*, 2009), в том числе и для борьбы с бактериями, имеющими множественную устойчивость к антибиотикам. В частности, один из таких препаратов, действие которого

направлено против бактериемии, вызванной *Staphylococcus aureus*, уже прошел первый этап клинических испытаний на добровольцах в США (<http://www.contrafect.com/pipeline/cf-301>).

Бактериофаги позиционируются как средство для элиминации патогенных бактерий из пищевых продуктов (i) путем использования их как пробиотиков; (ii) дезинфекции поверхностей, используемых для приготовления пищи; и (iii) прямой обработки продуктов питания (Sulakvelidze, 2013), в частности, литические бактериофаги, заражающие микроорганизмы рода *Listeria* одобрены контролирующими органами ЕС и США (Bren, 2007).

Представители рода *Bacillus* в последнее десятилетие становятся привлекательным объектом для сверхпродукции рекомбинантных белков и ферментов. Выявление новых транскрипционных факторов бактериофагов микроорганизмов группы *B. cereus* позволит выявить компоненты для дизайна новых систем сверхпродукции белков в бациллах и других близкородственных микроорганизмах.

Россия занимает более 10% от поверхности суши и является богатейшим объектом для поиска новых биоресурсов, в том числе и бактериофагов, инфицирующих почвенные бактерии. В этой работе мы описываем некоторые свойства ранее не охарактеризованных бактериофагов, выделенный на территории России, инфицирующих бактерии группы *Bacillus cereus*. Нами было проведено картирование геномной ДНК бактериофагов с помощью эндонуклеаз рестрикции и определены некоторые физиологические параметры хода инфекции чувствительных к бактериофагам штаммов.

Литература

1. Bardell, D. An 1898 Report by Gamaleya for a lytic agent specific for *Bacillus anthracis*. J. Hist. Med. Allied Sci. 1982, 37, 222–225.
2. Bren L: Bacteria-eating virus approved as food additive. FDA Consum 2007, 41:20-22. <http://undmedlibrary.org/images/users/dawn.hackman/597f2869435caf64709d849021509a49.pdf>
3. European Food Safety Authority (EFSA) Journal 2015;13(12):4329 [191 pp.]. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4329 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.4329/epdf>
4. D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. Res Microbiol. 2007 Sep;158(7):553-4. Epub 2007 Jul 28. PubMed PMID: 17855060.
5. Schofield DA, Molineux IJ, Westwater C. 'Bioluminescent' reporter phage for the detection of Category A bacterial pathogens. J Vis Exp. 2011 Jul 8;(53):e2740. doi: 10.3791/2740. PubMed PMID: 21775956; PubMed Central PMCID: PMC3196166.
6. Schuch R, Fischetti VA, Nelson DC. A genetic screen to identify bacteriophage lysins. Methods Mol Biol. 2009;502:307-19. doi: 10.1007/978-1-60327-565-1_18. PubMed PMID: 19082564; PubMed Central PMCID: PMC3863392.
7. Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev. 2008 Jul;32(4):579-606. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x. Epub 2008 Apr 15. Review. PubMed PMID: 18422617.
8. Sulakvelidze A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens. J Sci Food Agric. 2013 Oct;93(13):3137-46. doi: 10.1002/jsfa.6222. Epub 2013 Jun 17. Review. PubMed PMID: 23670852.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства инвестиций и инноваций Московской области в рамках научного проекта № 17-44-500067 p_a.

Селекция активных продуцентов лимонной кислоты из глюкозо-содержащего сырья и оптимизация условий их культивирования

Камзолова С.В.¹, Лунина Ю.Н.¹, Римович В.², Афонин А.В.³, Моргунов И.Г.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; luninaj@rambler.ru

²Вроцлавский университет экологии и биологических наук, г. Вроцлав, Польша

³ЗАО "ГосНИИСинтезбелок", г. Москва

Лимонная кислота (ЛК) является соединением, которое находит широкое применение в пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности. Перспективными продуцентами ЛК являются дрожжи *Yarrowia lipolytica*; их удобно культивировать в глубинных условиях, процессы легко масштабируются и автоматизируются [1]. В настоящее время разработаны процессы получения ЛК с помощью природных, мутантных и рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* из различного сырья: для технических нужд - из н-алканов и глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива, для пищевых и медицинских целей - из глюкозы, глицерина, этилового спирта и растительных масел. В последние годы инициированы исследования по получению ЛК из различных агропромышленных, пищевых и бытовых отходов, таких как глюкозо-содержащие гидролизаты древесины, инулин, ксилоза и др. ЛК, произведенная микробным синтезом, имеет статус GRAS и относится к безопасным продуктам [1].

Целью настоящей работы явилось изучение закономерностей синтеза ЛК дрожжами из глюкозо-содержащего сырья и разработка способа получения этого продукта.

Проведено широкое сравнительное исследование способности к сверхсинтезу ЛК из глюкозы у 43 природных и 4 мутантных штаммов дрожжей, относящихся к 19 видам. Установлено, что штаммы гетерогенны по признаку биосинтеза ЛК, в то время как биомасса была практически одинаковой. 17 штаммов, относящихся к видам *Candida intermedia*, *C. membranofaciens*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces globosus*, *Diutina rugosa*, *Filobasidium capsuligenum*, *Moesziomyces antarcticus*, *M. aphidis*, *Pichia media*, *Sugiyamaella paludigena*, *Wickerhamomyces bisporus*, и *Zygoascus hellenicus*, не синтезировали ЛК. Среди кислотообразователей, относящихся к видам *Aciculoconidium aculeatum*, *Blastobotrys adenivorans*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, *D. catenulate*, и *Y. lipolytica* накопление ЛК варьировало от 0,56 до 17,6 г/л. Наряду с ЛК дрожжи синтезировали побочный продукт – изолимонную кислоту (ИЛК). Максимальное соотношение ЛК к ИЛК (до 15:1) было у природного штамма *Y. lipolytica* VKM Y 2373 и мутанта *Y. lipolytica* МННГ40/УФ5 (условно названного *Y. lipolytica* № 15) [2].

Пять штаммов с высокой биосинтетической активностью были проверены в среде с глюкозо-содержащим гидролизатом. Глюкозо-содержащий гидролизат был получен из измельченных опилок осины при проведении ферментализации с использованием коммерческого ферментного препарата целлюлазы гриба *Trichoderma reesei* («Celluclast») с добавлением ферментного препарата целлюбиазы 188 («Novozymes», Дания), которые катализируют расщепление плохо сбраживаемой целлюлозы до легко усваиваемых углеводов - глюкозы, ксилозы и высших глюкозосодержащих полимеров. Содержание глюкозы в гидролизате составляло 15 г/л при общей сумме сахаров 35 г/л. Следует отметить, что в среде с глюкозо-содержащим гидролизатом кислотообразование было снижено в 3 – 4 раза в зависимости от штамма; накопление ЛК варьировало от 4,5 до 6,6 г/л; соотношение ЛК к ИЛК варьировало от 4:1 до 6:1. Наибольшее накопление ЛК (6,6 г/л) было отмечено у мутанта *Y. lipolytica* № 15. В ферментере на 144 ч роста при рабочей биомассе 6-7 г/л этот продуцент синтезировал 22 г/л ЛК с выходом ЛК от потребленной глюкозы ($Y_{\text{ЛК}}$) 50%. Аналогичные данные получены китайскими учеными с *Y. lipolytica* SWJ-1b, который синтезировал в среде с глюкозо-содержащим гидролизатом соломы 26,7 г/л ЛК на 120 ч и 42,4 г/л на 240 ч [3].

Проведено исследование влияния лимита по азоту, фосфору и сере на биосинтез ЛК из глюкозы с использованием природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373. В работе использовали 4 типа минеральных сред: 1) полноценная среда; 2) среда с лимитом по азоту, 3) среда с лимитом по фосфору и 4) среда с лимитом по сере. Лимитирование роста дрожжей биогенными элементами достигалось путем снижения концентрации той соли, в состав которой входил лимитирующий рост элемент. Как видно из табл. 1, в условиях культивирования *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 на полноценной среде синтеза ЛК не происходило. В условиях лимита по азоту экскреция ЛК начиналась в фазе замедления роста и активно происходила в стационарной фазе; на 144 ч в среде культивирования накапливалось 80 г/л ЛК и 6,5 г/л ИЛК; селективность процесса (ЛК/(ЛК+ИЛК)) составила 92,5%; выход ЛК от потребленной глюкозы ($Y_{\text{ЛК}}$) – 75%. В условиях лимита по фосфору в среде накапливалось 81 г/л ЛК с селективностью 95,3% и $Y_{\text{ЛК}}$ – 73%. В условиях лимита по сере в среде накапливалось 85 г/л ЛК с селективностью 95,3% и $Y_{\text{ЛК}}$ – 73%. Полученные данные показывают, что ограничение роста *Y. lipolytica* биогенными макроэлементами (N, P или S) является эффективным методом регуляции сверхсинтеза ЛК из глюкозы. Анализ активности ферментов, вовлеченных в метаболизм глюкозы и синтез ЛК у *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373, показал, что нет определенной корреляции между природой лимитирующего рост компонента и биосинтезом ЛК.

Табл. 1. Влияние природы лимитирующего рост компонента на биосинтез ЛК

Лимитирующий компонент	ЛК (г/л)	ИЛК (г/л)	ЛК/(ЛК+ИЛК)(%)	$Y_{\text{ЛК}}$ (%)
Полноценная среда	0	0	-	-
N	80	6,5	92,5	75
P	81	4,0	95,3	73
S	85	4,7	94,8	70

Мутант *Y. lipolytica* № 15 в условиях лимита по азоту в среде с глюкозой синтезировал около 100 г/л ЛК с селективностью процесса и выходом продукта от потребленной глюкозы ($Y_{\text{ЛК}}$) 96,3 и 63%, соответственно. Следует отметить, что мутант *Y. lipolytica* № 15 был чувствителен к высоким концентрациям ЛК в среде с глюкозой: при увеличении концентрации ЛК свыше 5 г цитрата/г клеток наблюдалось снижение скорости биосинтеза ЛК в 2,5 раза. С целью удержания мутанта в активном состоянии и увеличения эффективности биосинтеза ЛК, мы применили отъемно-доливной способ культивирования. При проведении экспериментов варьировали количеством доливаемой среды. Были исследованы следующие варианты проведения ферментации: 1) отъем-долив 40%, 5 циклов; 2) отъем-долив 30%, 5 циклов. Продолжительность цикла составляла 5-6 суток. Процесс культивирования продуцента *Y. lipolytica* в режиме отъемов-доливов продолжали в течение 1280 ч (53 суток). Даже в конце культивирования концентрация ЛК была высокой и составляла около 70 г/л. При всех изученных режимах селективность процесса составляло 97,4-97,2% от суммы кислот. При использовании режима отъем-долив 40% каждые 5 суток наблюдалась наиболее высокая продуктивность ферментера и выход ЛК, которые составляли 0,26 г/л•ч и 57%, соответственно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-08-00702.

Литература

1. Groenewald M. et al. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential // Crit Rev Microbiol. – 2014. – V. 40. – P. 187-206.
2. Лунина Ю.Н. Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого природного сырья // Диссертация ... кандидата биологических наук, 2016
3. Liu X. et al. Citric acid production from hydrolysate of pretreated straw cellulose by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using batch and fed-batch cultivation // Prep. Biochem. Biotechnol. - 2015. - V. 45(8). – P. 825-835.

Влияние мутаций в генах гликозилгидролаз на продукцию низкомолекулярных экзополисахаридов и симбиотические свойства штамма *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39

¹Канапина А.Ш., ²Марченков В.В., ²Сурин А.К., ¹Ашина Н.П., ¹Шляпников М.Г.,
¹Ивашина Т.В.

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пущино, doc.asya63@rambler.ru
²ФГБУН Институт белка РАН, г. Пущино

В основе формирования бобово-ризобияльного симбиоза лежит обмен молекулярными сигналами между симбиотическими партнерами. Помимо липохитоолигосахаридов (Nod-факторов) к бактериальным сигнальным факторам относят низкомолекулярные формы полисахаридов (ЭОС). Одним из возможных механизмов образования ЭОС является процессинг высокомолекулярных экзополисахаридов (ЭПС) специфическими гидролазами. В результате анализа генома *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 выявлены гены периплазматической гликозилгидролазы PssW и внеклеточных полисахаридлиаз PlyABC, потенциально участвующих в деполимеризации ЭПС. В представленной работе мы попытались ответить на следующие вопросы. Какие кислые ЭОС синтезируются симбиотическими бактериями *R.l.* bv. *viciae* VF39, влияют ли мутации в генах гликолитических ферментов на количество и структуру синтезируемых ЭОС, а также на формирование азотфиксирующего симбиоза с растениями *Pisum sativum*?

Штаммы *R.l.* bv. *viciae* VF39, мутантные по одному (*plyB*, *pssW*), двум (*plyBC*, *pssWplyB*) и трем генам (*pssWplyBC*), получены в результате аллельного замещения интактных генов на их делеционные варианты. В процессе культивирования у мутантов наблюдалось значительное увеличение вязкости культуральной жидкости по сравнению с родительским штаммом. Так, например, для штамма дикого типа вязкость составила 33±8 сР, для *plyB* – 56±15 сР, для *pssW* - 109±2 сР, *pssWplyB* – 128±18 сР, для *plyBC* – 174±42 сР, для *pssWplyBC* - 198±47 сР. Количественный анализ секретируемых в культуральную жидкость полисахаридов показал, что у всех исследуемых мутантов увеличение вязкости обусловлено как увеличением количества синтезируемого ЭПС, так и увеличением степени его полимеризации.

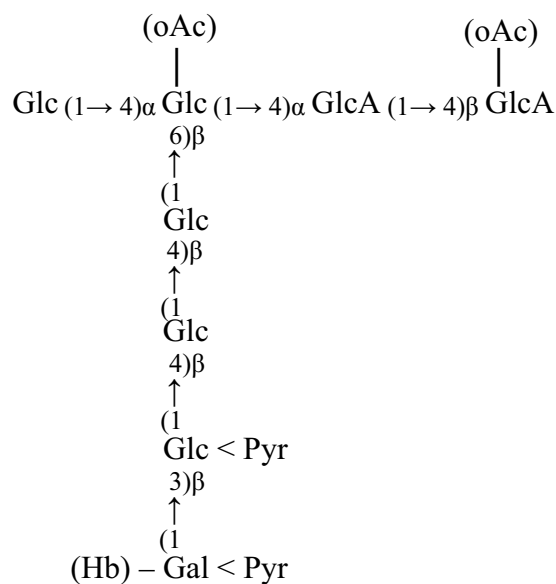
Масс-спектрометрический анализ позволил установить, что ЭОС, продуцируемые штаммом *R.l.* bv. *viciae* VF39 дикого типа, представлены в основном мономерами и димерами октасахарида. Октасахарид соответствует по структуре повторяющемуся звену кислого высокомолекулярного ЭПС, содержащего остатки D-Glc, D-GlcA и D-Gal (соотношение 5:2:1) и два остатка ацетала пировиноградной кислоты при C4 и C6 терминального остатка D-Gal и субтерминального остатка D-Glc боковой цепи. Количество других неуглеводных заместителей, а именно 3-гидроксибутирильной группы (Hb) и O-ацетильных групп (oAc) варьирует. Значительно меньшая часть ЭОС

представлена тримерами октасахарида. До 40% выделяемых в данных условиях кислых ЭОС составляют олигосахариды, степень полимеризации которых больше пяти.

С помощью тандемной масс-спектрометрии впервые показано, что на восстанавливающем конце реализуемого *in vivo* октасахарида расположены два остатка D-GlcA (рис. 1).

Также среди выделенных ЭОС обнаружены гептасахариды двух типов. Оба гептасахарида являются производными октасахаридного звена полимера. Установлено, что у мажорного гептасахарида отсутствует остаток D-Glc на восстанавливающем конце, а у минорного – остаток D-GlcA на восстанавливающем конце.

Рис. 1. Структура мономера ЭПС штамма *R.l. bv. viciae* VF39. В скобках отмечены неуглеводные заместители, наличие которых может варьировать от звена к звену.



Выполненный хроматографический и масс-спектрометрический анализ ЭОС, продуцируемых мутантными штаммами *pssW*, *plyB* и *pssWplyB*, не выявил существенных отличий от ЭОС штамма дикого типа. Установлено, что мутация в гене *pssW* приводит к практически полному отсутствию гептасахарида без остатка D-GlcA, у мутанта *plyB* снижается количество гептасахарида без глюкозного остатка. У двойного *pssWplyB*-мутанта гептасахариды не обнаружены. И у штамма дикого типа и у мутантов выявлена определённая закономерность: фиксируемые на спектрах мажорные пики мономера – это преимущественно октасахариды без oAc и Hb групп и октасахариды, содержащие по одной oAc и Hb группе. И, наоборот, среди димеров преобладают формы с повышенным содержанием указанных выше неуглеводных заместителей. У тримеров эта тенденция лишь усиливается. По-видимому, наличие, количество и распределение этих групп вдоль цепи полимера влияет на работу гидролаз.

Определение структур обнаруженных гептасахаридов и анализ минорных форм неполных димеров позволил сделать предположение о локализации сайтов гидролиза для PssW и PlyB. Кроме того, высказано предположение о существовании в геноме *R.l. bv. viciae* VF39 гена гликозилгидролазы, расщепляющей связь между терминальным остатком D-Gal и субтерминальным остатком D-Glc боковой цепи октасахаридного звена ЭПС.

Полученные мутантные штаммы проанализированы на способность к образованию азотфиксирующего симбиоза с растениями *Pisum sativum* сорта Frisson в стерильных микровегетационных опытах. Показано, что все они индуцируют образование клубеньков, однако, количество, форма и размер клубеньков отличаются от клубеньков контрольного растения. Методом восстановления ацетилена установлено, что у клубеньков, образованных мутантами, наблюдается снижение нитрогеназной активности.

**Пути метаболизма метанола и метиламина у нового
грамположительного факультативного метилотрофа из рода
*Rhodococcus***

Капаруллина Е.Н., Чемодурова А.А., Доронина Н.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, lenokap80@gmail.com
ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт»

C₁-соединения биогенного и абиогенного происхождения являются субстратами для специализированной группы - аэробных метилотрофных бактерий. Наземные и морские экосистемы являются источниками метанола, метиламина и других C₁-соединений. Метанол образуется при деметилировании пектина клеточных стенок при активном росте клеток растений и является основным летучим органическим метаболитом растений, поскольку его эмиссия в атмосферу составляет 100 Тг/год, часть его растворяется в поверхностных слоях океана. Метилированные амины – восстановленные формы органического азота, которые образуются в природе как побочные продукты разложения белков, аминокислот, некоторых алкалоидов, азотсодержащих пестицидов, присутствуют в растительных и животных тканях как естественные продукты азотного обмена. В морской среде, метиламин высвобождается при деградации четвертичных аминов, таких как бетаин, карнитин, холин и N-оксид триметиламина, которые используются в качестве осмолитов многими морскими организмами. Представители рода *Rhodococcus* широко распространены в природе и обладают большой метаболической пластичностью, являются перспективными промышленными микроорганизмами для биотрансформации, биодеградаци и биодетекции многих экологически важных органических соединений. Однако метилотрофные виды рода *Rhodococcus* до сих пор не описаны. Из прибрежной зоны Азовского моря нами выделен новый грамположительный факультативный метилотроф, характеристика которого является целью данной работы.

Штамм 2AzMo представлен аэробными, грамположительными неподвижными палочками. Оптимально растет при 28°C и pH 7.5 в присутствии 1% NaCl и 1% CH₃OH или 0,3% метиламина в качестве источника углерода. Кроме того, исследуемый штамм использует широкий спектр полиуглеродных субстратов.

Секвенирование гена 16S рРНК штамма 2AzMo выявило сходство с представителями рода *Rhodococcus*: 99,9% с *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T (=NCIMB 13082^T), 99,4% с *R. imtechensis* IEGM 940^T (=RKJ300^T) и 99,2% с *R. koreensis* IEGM 962^T (=DNP505^T). Нами показано, что в отличие от нашего изолята, типовой штамм *R. wratislaviensis* NCIMB 13082^T, а также другие родококки (*R. imtechensis* IEGM 940^T, *R. koreensis* IEGM 962^T, *R. opacus* IEGM 716^T) не способны расти на метаноле или метиламине в качестве источников углерода и энергии. Для определения генотипических различий между штаммом 2AzMo и *R. wratislaviensis* IEGM 1112^T использовали также метод случайно амплифицируемой полиморфной ДНК (RAPD-анализ). Результаты RAPD-анализа показали, что штаммы имеют различные паттерны продуктов амплификации, что свидетельствует о том, что исследуемый штамм 2AzMo, вероятно, представляет собой новый вид. Подтверждение получено и с использованием MALDI-TOF/MS анализа близких штаммов рода *Rhodococcus*, который выявил высокое разрешение, поскольку штаммы хорошо дифференцировались между собой и от нашего изолята на основании белковых профилей.

Окисление метанола у штамма *Rhodococcus* sp. 2AzMo осуществляется метанолдегидрогеназой, использующей 4-нитрозо-N,N-диметиланилин в качестве искусственного акцептора электронов, что согласуется с литературными данными для представителей родов *Amiclatopsis* и *Mycobacterium*. Выявленные нами активности дегидрогеназ формальдегида и формиата с искусственным акцептором электронов феназинметосульфатом выше по сравнению с НАД - зависимыми формами этих

ферментов. У штамма *Rhodococcus* sp. 2AzMo отсутствуют активности специфических ферментов серинового (оксипируватредуктазы и серин-глиоксилат аминотрансферазы) и рибулозобисфосфатного (рибулозобисфосфаткарбоксилазы) путей. Исследуемый штамм реализует рибулозомонофосфатный (РМФ) путь C₁ - метаболизма, о чём свидетельствует активность ключевого фермента этого пути – гексулозофосфатсинтазы. *Rhodococcus* sp. 2AzMo также имеет гексокиназу, активную с АТФ и ферменты окислительного пентозофосфатного пути (дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата). Обнаружена активность альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата (ФБФ), но не выявлена альдолаза 2- кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюконата. Следовательно, данный штамм реализует ФБФ - вариант РМФ-пути.

Окисление метиламина у *Rhodococcus* sp. 2AzMo происходит прямым путем метиламиндегидрогеназой и посредством системы ферментов N-метилглутаматного пути. Аммоний ассимилируется восстановительным аминированием α-кетоглутарата и посредством глутаматного цикла.

Таким образом, впервые получена характеристика путей метаболизма метанола и метиламина у нового метилотрофного представителя рода *Rhodococcus*.

Иммобилизованные актинобактерии *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782 как основа для определения орто-фталата натрия в водной среде

Кувичкина Т.Н.¹, Гридина В.В.², Капаруллина Е.Н.¹, Доронина Н.В.¹, Решетиллов А.Н.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина,
г. Пущино

² ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»

Из прибрежной зоны Азовского моря выделен новый штамм (2AzMo), который способен расти на метаноле и метиламине как источниках углерода и энергии. Секвенирование гена 16S рНК штамма выявило его сходство с представителем рода *Rhodococcus*: 99.9% с *R. wratislaviensis* IEGM 1112T (=NCIMB 13082T. Высокий уровень сходства с ним позволил отнести новый изолят к виду *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782. Представители рода *Rhodococcus* имеют широкие метаболические возможности и осуществляют окисление природных и антропогенных углеводов. Даже небольшие дозы фталатов, попадающие в организм человека, могут приводить к изменению гормонального фона, нарушению работы печени и почек [1]. Показано, что штамм актинобактерий *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет разложение орто-фталевой кислоты (до 8 г/л 46 мМ) через 3,4-дигидроксифталевую кислоту [2]. В молекуле 3,4-дигидроксифталевой кислоты появляется два атома кислорода. Можно предположить, что окисление орто-фталата ферментами микроорганизма происходит с потреблением молекулярного кислорода. Следовательно, для изучения этого процесса подойдёт биосенсорный, а именно, амперометрический метод. Разработан биосенсор на основе актинобактерий *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2631Д для определения динатриевой соли орто-фталевой кислоты [3, 4]. Предстояло проверить может ли вновь выделенный штамм *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782 быть основой для определения динатриевой соли орто-фталевой кислоты

Целью работы являлось создание лабораторной модели биосенсора на основе штамма *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782 для определения фталатов на примере динатриевой соли орто-фталевой кислоты.

Кислородный электрод Кларка использовали в качестве преобразователя. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода в измеряемом водном образце. Клетки выращивали в жидкой питательной среде (метанол в качестве единственного источника

углерода и энергии) в колбах на качалке. Биомассу (конец экспоненциальной фазы роста) отделяли центрифугированием, дважды промывали буфером и использовали для иммобилизации. Иммобилизованные клетки (ИМК) получали методом физической адсорбции на носителе (хроматографическая стеклбумага GF/A).

Для изучения зависимости ответа биосенсора (потребление кислорода ИМК) от концентраций динатриевой соли орто-фталевой кислоты субстрат варьировали от 0,8 до 50,0 мМ (Рис.1).

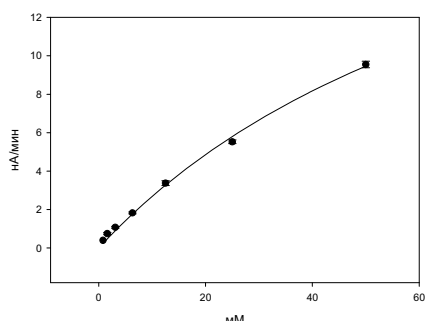


Рис.1. Градуировочная зависимость ответа биосенсора на основе ИМК *R. wratislaviensis* ВКМ Ас-2782 от концентрации динатриевой соли орто-фталевой кислоты

Для изучаемого субстрата скорость окисления росла по мере повышения его концентрации. Используя кривую субстратной зависимости (градуировочная зависимость рис. 1) и компьютерную программу для нелинейной регрессии, вычислили значения максимальной скорости потребления кислорода ИМК ($V_{\text{макс}}$) и кажущуюся константу средства к субстрату ($K_{M(\text{каж})}$) по уравнению Михаэлиса - Ментен.

Табл. Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен градуировочной зависимости ответов сенсора на основе штамма *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782

Микроорганизм для рецепторного элемента	Кажущаяся константа Михаэлиса $K_{M(\text{каж})}$, мМ	Максимальная скорость потребления кислорода $V_{\text{макс}}$, нА/мин
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> ВКМ Ас-2782	$85,5 \pm 8,2$	$25,6 \pm 1,7$

Таким образом показано, что штамм *Rhodococcus wratislaviensis* ВКМ Ас-2782 может быть рецептором амперометрического биосенсора для определения динатриевой соли орто-фталевой кислоты. Время измерения указанного соединения не превышало 20 мин. Долговременная стабильность была 9 суток.

Литература

1. Liang D.W., Zhang T., Fang H. Phtalates biodegradation in the environment // Appl. Microbiotechnol. 2008. V.80. P. 183-198.
2. Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. Деструкция ароматических углеводов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из отходов соледобывающего предприятия // Прикладная биохим. и микробиол. - 2013. - Т. 49. - №3. - С. 267-278.
3. Кувичкина Т.Н., Будина Д.В., Олькова А.С., Плотникова Е.Г., Макаренко А.А., Решетилов А.Н. Биосенсор для определения динатриевой соли ортофталата в водной среде // Бюллетень изобретений полезных моделей. 10.11.2015. № 31. Патент РФ на полезную модель № 156546. Заявка № 2015125211/04.

4. Кувичкина Т.Н., Будина Д.В., Решетиллов А.Н. Окислительная деградация ортофталата иммобилизованными клетками *Rhodococcus* и *Gluconobacter* // Международный Научный Институт "Educatio" г. Новосибирск 2015. Часть 4 № 5 (12). С. 38-41.

Регуляция трансформации целлобиозы путем взаимодействия целлобиозо-дегидрогеназы и бета-глюкозидазы гриба *Cerrena unicolor*

Лисов А.В.^{1,2}, Белова О.В.¹, Винокурова Н.Г.¹, Леонтьевский А.А.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, г. Пущино, ssl204@rambler.ru

²ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт»

Разложение клеточной стенки растений осуществляется грибами с помощью различных ферментов. Одной группой таких ферментов являются гидролазы, катализирующие гидролиз полисахаридов клеточной стенки. Это целлюлазы, гемицеллюлазы, бета-глюкозидазы. Другими ферментами, участвующими в разрушении клеточных стенок растений, являются оксидоредуктазы. В первую очередь это пероксидазы и оксидазы, участвующие в разложении лигнина. Так же грибы выделяют медьсодержащие оксидазы, катализирующие разрыв полимерной цепи микрокристаллической целлюлозы. Однако, взаимодействие этих двух групп ферментов малоизученно. Еще одной оксидоредуктазой, участвующей в разложении клеточных стенок растений, является целлобиозо-дегидрогеназа. Этот фермент катализирует окисление целлобиозы хинонами. Таким образом, одним из субстратов этого фермента является целлобиоза, которая так же расщепляется до глюкозы другим ферментом – бета-глюкозидазой. В результате, между бета-глюкозидазой и целлобиозо-дегидрогеназой существует конкуренция за субстрат, результат которой определяет трансформацию целлобиозы – до глюкозы или целлобианолактона.

Целью данной работы было изучить конкуренцию между целлобиозо-дегидрогеназой и бета-глюкозидазой за целлобиозу. Для этого из культуральной жидкости гриба *C. unicolor* были очищены целлобиозо-дегидрогеназа и бета-глюкозидаза. Целлобиозо-дегидрогеназа обладала умеренной термостабильностью и кислым оптимумом pH. Бета-глюкозидаза обладала так же кислым оптимумом pH и низкой термостабильностью. Оба фермента эффективно трансформировали целлобиозу. В ходе изучения конкуренции этих ферментов за целлобиозу было показано, что образование целлобианолактона как результата действия на целлобиозу целлобиозо-дегидрогеназы зависит от доступности для фермента хинонов. Хиноны, в свою очередь, формируются в результате взаимодействия фенольных соединений с лакказой. При низких концентрациях хинонов, то есть лакказы и/или фенольного соединения, целлобиоза гидролизуеться бета-глюкозидазой до глюкозы. Такое взаимодействие может определять усиление индукции целлюлолитических ферментов в лигнинолитических условиях.

Получение новых ферментных препаратов методом геномного скрининга

Лисов А.В.^{1,2}, Белова О.В.¹, Лисова З.А.¹, Самойленко В.А.¹,
Андреева-Ковалевская Ж.И.¹, Нагорных М.О.¹, Захарова М.В.¹, Шадрин А.М.¹,
Солонин А.С.^{1,2}, Леонтьевский А.А.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; ssl204@rambler.ru

² ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт»

Ферменты активно используются в различных отраслях хозяйства - пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине, текстильной промышленности. Поэтому получение новых ферментных препаратов для применения в различных отраслях человеческого хозяйства является актуальной задачей. В настоящее время массово секвенируются геномы различных микроорганизмов, что облегчает поиск генов, кодирующих практически важные ферменты.

Целью работы являлось разработка новых ферментных препаратов, используемых для улучшения питательных свойств кормов животных. На начальном этапе работы из Всероссийской коллекции микроорганизмов были получены 18 штаммов бактерий, для которых известны полные геномные последовательности. В геномах этих бактерий были отобраны несколько сотен генов, потенциально кодирующих используемые в практике ферменты. Гены были клонированы, были получены рекомбинантные продуценты ферментов. Ферменты были экспрессированы и очищены. Были изучены свойства ферментов. На основании изучения свойств ферментов были отобраны ферменты с оптимальными свойствами – температурной стабильностью, удельной активностью, рН оптимум. Далее была проведена отработка культивирования рекомбинантных продуцентов в ферментерах и отработана технология получения ферментных препаратов, которая включала отделение биомассы, концентрирование ферментного препарата и сушку ферментного препарата. В результате получен новый ферментный препарат с активностью ксиланазы 12000 Ед/гр, бета-глюканазы – 8000 Ед/гр, целлюлазы – 6000 Ед/гр.

Особенности трансформация стероидов умеренно термофильным штаммом *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ас-666

Лобастова Т.Г., Фокина В.В., Шумов А.А., Донова М.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; lobastova@ibpm.pushchino.ru

В настоящее время термофильные микроорганизмы находят широкое применение благодаря их многочисленным преимуществам, таким, как способность выдерживать повышенные температуры, влияние органических растворителей, детергентов и других агрессивных внешних факторов по сравнению с мезофильными штаммами [1]. Ферменты термофильных микроорганизмов широко используются в биотехнологиях производства моющих средств, пищевых продуктов, кормов, а также в переработке различных отходов, целлюлозно-бумажной, текстильной и добывающей промышленности [2].

Однако сообщения об использовании термофильных бактерий, модифицирующих стероиды, встречаются крайне редко [3]. Некоторые бактериальные термофильные микроорганизмы способны осуществлять модификации стероидов [4, 5]. Сообщалось, что умеренно термофильные почвенные бактерии *Geobacillus stearothermophilus* модифицировали производные прогестерона и тестостерон с образованием

гидроксированных метаболитов [6, 7]. *Geobacillus kaustophilus*, другой умеренно термофильный штамм, также был способен модифицировать прогестерон и тестостерон [8]. Экстремально термофильная архея *Sulfolobus solfataricus* (= *Calderiella acidophila* MT4), оптимально развивающаяся при 87°C, проводила регио- и стереоспецифическое восстановление 3-кетогруппы, а также Δ^4 -двойной связи в различных стероидных кетонах, таких, как прогестерон [9].

Ранее нами было показано, что актинобактериальный штамм *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ас-666 способен трансформировать литохоловую кислоту [10]. Умеренно термофильный штамм *S. hirsuta* был выделен из спонтанно разогревающихся снопов сахарного тростника после извлечения из них сахара [11].

В настоящей работе проведено изучение особенностей биоконверсии ряда стероидных субстратов: андрост-4-ен-3,17-диона, тестостерона, дегидроэпиандростерона, гидрокортизона, 6-альфа-метилгидрокортизона, прегненолона, 21-ацетилованных производных ряда прегнана, ситостерина и холестерина умеренно термофильным штаммом *S. hirsuta* ВКМ Ас-666.

Штамм осуществлял дезацетилирование по положению 21 соответствующих сложных стероидных эфиров, проводил модификацию 3 β -гидрокси-5-ен- в 3-кето-4-ен-структуру, эффективно катализировал 1(2)-дегидрирование 3-кето-стероидов; был способен к деградации боковой цепи С21 стероидов; проводил 20 β -восстановление 20-кетогруппы С21 стероидов и окисление 17 β -гидроксигруппы С19 стероидов. Результаты свидетельствуют о перспективности использования штамма *S. hirsuta* ВКМ Ас-666 в биоконверсии стероидных субстратов.

Литература

- [1] Afzal, M.; Al-Awadhi, S.; and Oommen, S. *Br. Biotechnol. J.* **2013**, 3[4] 581–591.
- [2] Littlechild, J., Novak, H., James, P., and Sayer, C. *in: Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology* Eds. Satyanarayana, T., Littlechild, J., Kawarabayasi, Y. **2013**, 481–507.
- [3] Wiegel, J., Ljungdahl, L. G., & Demain A. L. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1985**, 3[1] 39–108.
- [4] Smith, K. E.; Williams, R. A. D.; Sideso O. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, 92[1] 29–34.
- [5] Sideso, O.; Williams, R.A.D.; Welch, S.G.; Smith, K.E. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 67 163–169.
- [6] Al-Awadi, S., Afzal, M., Oommen, *Biocatal. Biotrans.* **2007**, 25[1] 43–50.
- [7] Al-Awadi, S., Afzal, M., Oommen, S. *Steroids* **2005**, 70 327–333.
- [8] Al-Tamimi, S.; Al-Awadi, S.; Oommen, S.; Afzal, M. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2010**, 61[1] 78–86.
- [9] Sodano, G.; Trabucco, A.; DeRosa, M.; Gambacorta, A. *Experientia* **1982**, 38 1311.
- [10] Kollerov, V. V.; Monti, D.; Deshcherevskaya, N. O.; Lobastova, T. G.; Ferrandi; E. E.; Larovere, A.; Gulevskaya, S. A.; Riva, S.; Donova, M. V. *Steroids* **2013**, 78 370–378.
- [11] Lacey, J.; and Goodfellow, M. *J. Gen. Microbiol.* **1975**, 88 75–85.

Зачем грибы *Trichoderma* синтезируют внеклеточную L-лизин α-оксидазу?

Макрушин К.В., Баскунов Б.П., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино aarin@rambler.ru

Грибы *Trichoderma* синтезируют множество метаболитов, включая литические ферменты, а также антибиотики различного химического строения, что обеспечивает им высокий адаптационный потенциал. Именно способность к синтезу таких соединений играют важную роль в формировании микробиоценозов почвы и лежит в основе использования этих грибов в качестве экологически безопасных биопестицидов в борьбе с инфекционными болезнями растений) [1].

Кроме указанных выше метаболитов некоторые штаммы грибов *Trichoderma* способны синтезировать оксидазы L-аминокислот, в том числе внеклеточную L-лизин α-оксидазу (ЛизО) [2, 3]. Этот фермент является предметом интенсивного изучения благодаря потенциалу его применения в биотехнологии и медицине [4]. При этом его синтез грибами *Trichoderma* остается за рамками изучения его роли в природном окружении, в том числе как одного из факторов, контролирующих численность фитопатогенов.

Цель данной работы - показать возможную физиологическую функцию внеклеточной ЛизО из гриба *Trichoderma* cf. *aureoviride* Rifai VKMF-4268D.

В настоящем исследовании впервые показан синтез ЛизО в процессе роста гриба *Trichoderma* на различных злаковых растениях: кукуруза (*Zea mays*), пшеница (*Triticum durum*), рожь (*Secale cereale*), просо (*Panicum miliaceum*), ячмень (*Hordeum vulgare*), овес (*Avena sativa*), вейник наземный (*Calamagrostis epigjos*), костер безостый (*Bromus inermis*), пырей ползучий (*Elytrigia repens*), мятлик луговой (*Poa pratensis*), ежа сборная (*Dactylis glomerata*). На всех указанных злаковых процесс биосинтеза ЛизО сопровождался накоплением в ростовой среде H_2O_2 (продукта ферментативного окислительного дезаминирования L-лизина), а также внеклеточных протеолитических ферментов, гидролизующих белковые компоненты пшеничных отрубей и обеспечивающих поступление в среду роста аминокислот, в том числе и лизина.

Наряду с различными аминокислотами, протеазами и H_2O_2 в среде роста была обнаружена пипеколиновая кислота (в концентрации до 20 мкМ), образующаяся, вероятно, из 2-кето-6-аминокапроата. Это соединение было идентифицировано с помощью масс-спектрометрии (Finnigan LCQ Advantage MAX, Germany) (рис. 2).

В последних обзорах и оригинальных работах [5, 6] представлены результаты, указывающие на то, что H_2O_2 (и другие активные формы кислорода) и пипеколиновая кислота играют центральные роли в индукции и развитии системной устойчивости растений (SAR). Пипеколиновая кислота индуцирует синтез растительных гормонов – жасминовой и салициловой кислот, ответственных за устойчивость растения к некротрофам и биотрофам. H_2O_2 (и другие активные формы кислорода) является ключевым элементом в активации митоген-активируемых протеиназ, также участвующих в иммунном ответе растений при биотических и абиотических стрессах [5, 6]. В условиях искусственного фитопатогенного фона защитное действие пипеколиновой кислоты, грубого препарата LysOx, а также гриба *Trichoderma* продемонстрировано на модельном растении (фасоли). На тестовых микроорганизмах показано антимикробное действие ЛизО (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Clostridium sporogenes* ГИСК 272, *Aspergillus niger* ATCC 9642, а также *Fusarium decemcellulare* F-1179 и *Rhizoctonia solanum*).

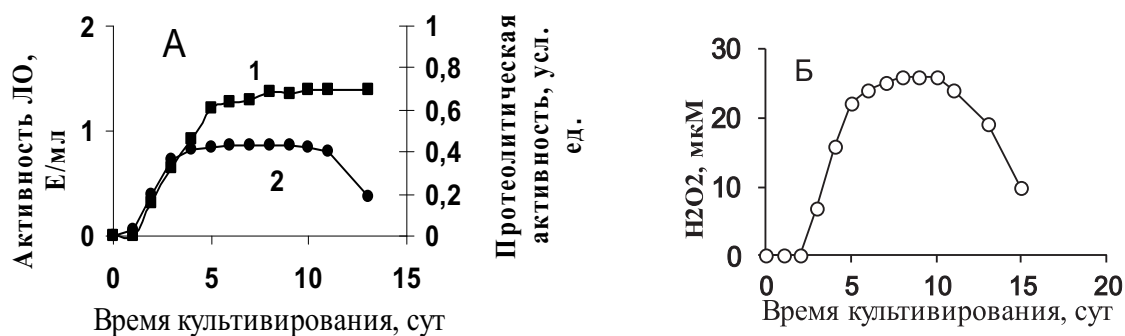


Рис. 1. Динамика накопления ЛизО (А), протеолитической активности (А) и H_2O_2 (Б) в среде культивирования *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D на мятлике луговом (*Poa pratensis*)

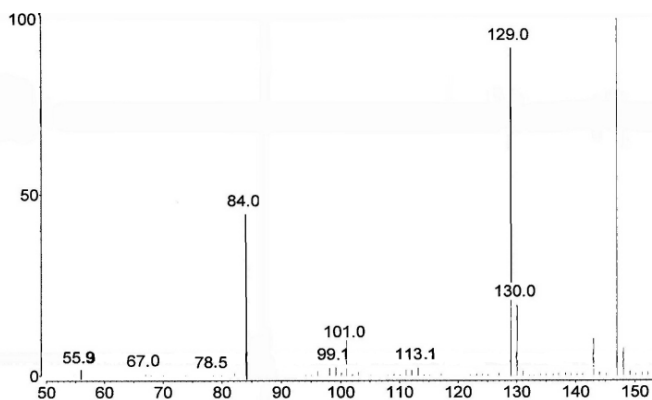


Рис. 2. Масс-спектрометрическая характеристика метаболита (пипеколиновая кислота) *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai VKMF-4268D

Установлено, что ЛизО является ферментом с широким рН оптимумом (рН 4.0-8.9), стабильным при хранении, устойчивым к действию детергентов (СДС), мочевины, протеаз и температуры.

Показаны высокая активность (90 Е/мг белка), высокая селективность и абсолютная стереоспецифичность ЛизО, а также высокое сродство к лизину ($K_m \approx 10^{-5}M$) [7].

Указанные антимикробные и ферментативные (включая кинетические) свойства, а также образование пипеколиновой кислоты и H_2O_2 - определяют функциональную роль внеклеточной ЛизО. С одной стороны, ЛизО выполняет защитные функции для продуцента - наряду с другими внеклеточными белками (протеазами и антибактериальными пептидами) обеспечивает адаптивное преимущество в конкуренции с другими организмами. С другой стороны, ЛизО, может участвовать в индуцировании системной устойчивости растений и регулировать взаимоотношения “*Trichoderma* – растение – патоген”.

В эволюционном смысле, системная устойчивость базируется на нескольких стратегиях, которые значительно различаются от вида к виду. Маловероятно, что существует единый ключ регуляции, ЛизО - лишь один из механизмов.

Литература

1. F. Vinalea, K. Sivasithamparamb, E. L. Ghisalbertic, R. M. Sheridan, L. Wooa, M. Loritoa // *Biology & Biochemistry*. 2008, 40, 1–10.
2. Лукашева Е.В., Ефремова А.А., Трещалина Е.М., Аринбасарова А.Ю., Меденцев А.Г., Березов Т.Т. Вопросы медицинской химии. 2012. Т.58.- №4. С. 372-384.
3. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Misono H., Soda K. *J Biol Chem*. 1980. V. 255. №3. P. 976-981.
4. Pokrovsky V.S., Treshalina H.M., Lukashova E.V., Sedakova L.A., Medentzev A.G., Arinbasarova A.Y., Berezov T.T. *Anticancer Drugs*. 2013. Vol. 8. N. 24. P. 846–851.
5. Bernsdorff F, Döring AC, Gruner K, Schuck S, Bräutigam A, Zeier J. // *Plant Cell*. 2016, 28, 102-29.
6. Návárová H, Bernsdorff F, Döring AC, Zeier J.//*Plant Cell*. 2012; 24(12):5123-41.
7. Krupyanko V.I., Medentsev A.G., Lukashova E.V., Arinbasarova A.Yu. // *BBRep*. – 2017. – Vol. 9. – P. 9-12.

Метод теоретического определения величины максимального выхода биомассы

Минкевич И.Г.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, minkevich@ibpm.pushchino.ru

Разработан метод вычисления значений максимального выхода биомассы при аэробном росте микроорганизмов на различных субстратах. Этот метод применим к любым микроорганизмам, не являющимся сверхсинтетиками липидов и растущим на органическом субстрате. Для вычисления выхода необходимо знание особенностей путей первичной метаболизации данного субстрата в данном организме.

Для разработки метода проведен математический анализ влияния детальных особенностей метаболических путей клеток на материально-энергетический баланс метаболизма в целом. Обоснованы принципы разделения целостного метаболизма на конструктивный и энергетический обмены. В свою очередь, конструктивный обмен разделен на две части – передний и стандартный конструктивные обмены. Введено понятие узловых метаболитов, находящихся на границе переднего и стандартного конструктивных обменов. В качестве узловых метаболитов взяты известные предшественники синтеза блоков макромолекул клеток: глюкоза, ацетил-КоА, 2-кетоглутарат, эритрозо-4-фосфат, оксалоацетат, рибозо-5-фосфат, 3-фосфоглицерат, фосфоенолпируват и пируват. Стандартный конструктивный метаболизм конвертирует узловые метаболиты в вещество биомассы и не зависит от вида субстрата роста. Передний конструктивный метаболизм конвертирует субстрат в узловые метаболиты и существенно зависит от субстрата роста. Сформулирована система уравнений, описывающих балансы количеств 1) восстановленности метаболитов и 2) образованных и затраченных макроэргических связей. Биоэнергетические характеристики стандартного конструктивного обмена найдены из большого числа данных для роста различных микроорганизмов на глюкозе и показывающих, что выход биомассы в оптимальных условиях роста равен 0.5. Соответствующие характеристики переднего конструктивного обмена находятся с помощью разработанного нами пакета компьютерных программ, названного как генератор метаболических путей (GenMetPath). Как отдельный случай, рассмотрен рост на субстратах требующих участия оксигеназ и/или оксидаз для метаболизации субстрата.

В качестве примера рассмотрен рост культуры микроорганизмов на этаноле как органическом субстрате. Вычисленный максимальный выход из этанола равен 0.89. Ранее нами было экспериментально получено значение максимального выхода при непрерывном культивировании дрожжей *Candida valida*, равное 0.875 ± 0.013 . Это показывает высокую степень соответствия теории и эксперимента.

Изучение антиоксидантных свойств изолимонной кислоты в модели окислительного стресса, индуцированного действием перекиси водорода на *Paramecium caudatum* и *Yarrowia lipolytica*

*Моргунов И.Г.¹, Камзолова С.В.¹, Карпухина О.В.², Лунина Ю.Н.¹, Аллаяров Р.К.¹,
Самойленко В.А.¹, Иноземцев А.Н.²*

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; morgunovs@rambler.ru

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Определение новых веществ, действие которых направлено на нормализацию метаболических процессов, на блокаду свободно радикальных процессов в клетке является важным аспектом в исследованиях механизмов адаптации организмов к воздействию токсических соединений. Мы выдвинули предположение, что изолимонная кислота (ИЛК) - один из ключевых метаболитов Цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) может обладать антиоксидантными свойствами. Реакции превращения ИЛК являются ключевыми регуляторными реакциями, регулирующими функционирование цикла. ИЛК – единственный известный метаболит цикла, который может снимать блок с сукцинат-дегидрогеназы; и, следовательно, ИЛК способствует максимальному использованию кислорода клеткой, даже при длительных интенсивных стресс-реакциях. При этом, по-видимому, не происходит увеличения абсолютного количества поглощаемого кислорода, а изоцитрат лишь позволяет клетке максимально использовать имеющиеся запасы кислорода.

Целью настоящей работы явилась наработка препарата ИЛК фармакопейной чистоты и оценка её влияния на окислительный стресс, индуцированный действием перекиси водорода.

Наработку препарата ИЛК осуществляли с помощью природного штамма *Y. lipolytica* ВКМ Y-2373 на среде [1]. На 144 ч накапливалось 70 г/л ИЛК; в качестве побочного продукта ферментации накапливалась лимонная кислота (ЛК) – 23 г/л, селективность процесса составила 75%, выход продукта ($Y_{\text{ИЛК}}$) 0,70 г/г потребленного этанола. Выделение монокалийевой соли ИЛК из культуральной жидкости проводилось в несколько стадий. На первой стадии осуществляли отделение биомассы продуцента от среды культивирования центрифугированием. На второй стадии супернатант, содержащий ИЛК и ЛК, подвергали концентрированию до концентрации ИЛК выше 300 г/л. Далее проводили следующие процедуры: подкисление концентрата до pH=3,3 – 3,5 при температуре 0-5 °С, кристаллизацию монокалийевой соли ИЛК, фильтрацию кристаллов, двойную промывку кристаллов с 50% и 96% этиловым спиртом и высушивание кристаллов. Выход первичного продукта ИЛК составлял 70% при содержании основного вещества 81 - 95%. Для получения монокалийевой соли ИЛК фармакопейной квалификации первые кристаллы подвергали перекристаллизации, в результате чего содержание основного вещества в кристаллах повышалось до 99.9%; средний выход продукта в пересчете на 100%-е вещество составляет 82% от первичных кристаллов.

ИЛК тестировали в модели окислительного стресса, индуцированного действием перекиси водорода на клетки инфузории *Paramecium caudatum* и *Yarrowia lipolytica*.

Инфузории представляют собой удобную модель для биотестирования химических веществ, так как они имеют относительно их размеров большую поверхность соприкосновения с внешней средой, сразу же вступают в контакт с токсикантами, реагируя на химическое действие целым комплексом биологических, физиологических и биохимических изменений: скоростью фагоцитоза, хемотаксисом, направлением и скоростью движения, реверсией ресничной активности, скоростью размножения [2]. Внесение в среду с инфузориями 0.3 мМ перекиси водорода приводило к тому, что после 5-ти минутной экспозиции оставались жизнеспособными 9 % клеток; 100% смертность инфузорий от действия H_2O_2 отмечена при экспозиции 45 мин. Микроскопические исследования показали, что под влиянием H_2O_2 в клетках *P. caudatum* происходил ряд морфологических изменений, в том числе, набухание органелл цитоплазмы, влекущее за собой разрыв мембраны клетки парамеций. На рис. 1 представлены данные о выживаемости *P. caudatum* при внесении в среду H_2O_2 на фоне предварительной инкубации клеток с ИЛК (в течение 45 мин). В качестве препарата сравнения использовали классический антиоксидант - аскорбиновую кислоту. Как видно из рисунка, предобработка клеток с 0,5 мМ ИЛК ингибировала прооксидантное действие H_2O_2 и увеличивала выживаемость клеток более чем в 25 раз по сравнению с контролем. Кроме того, выявлена зависимость положительного эффекта ИЛК от дозы, она проявляет наиболее значимый антиоксидантный эффект в концентрации 10 мМ и по протективному действию превосходит классический антиоксидант – аскорбиновую кислоту.

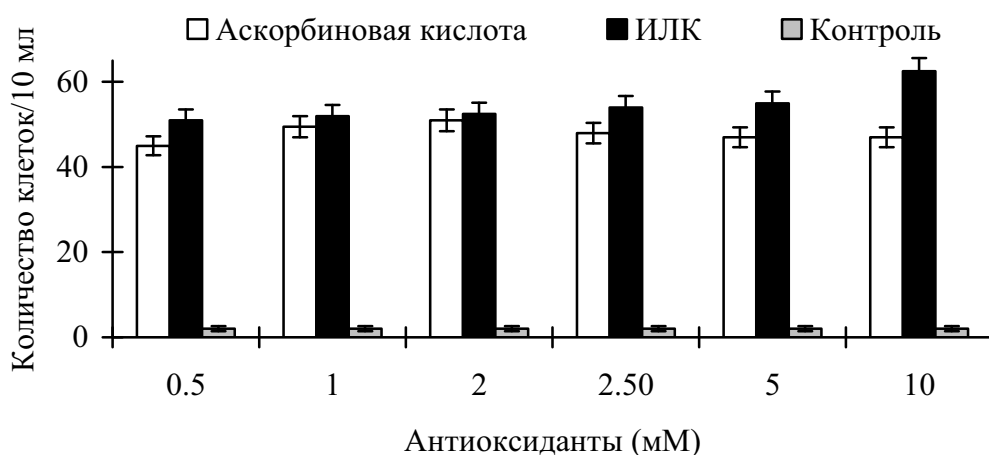


Рис. 1. Выживаемость парамеций при действии H_2O_2 , ИЛК и аскорбиновой кислоты

Аналогичные данные по выживаемости на фоне ИЛК получены для дрожжей *Y. lipolytica* 212. Инкубация клеток с 180 и 400 мМ H_2O_2 в течение 1 ч приводила к ингибированию 50 и 100% клеток *Y. lipolytica*, соответственно. Высокая устойчивость клеток *Y. lipolytica* к перекиси водорода по сравнению с парамециями объяснялась экскрецией органических кислот (α -кетоглутаровой, пировиноградной и других кислот) и их участием в разложении H_2O_2 . Преобработка клеток с 0,5 мМ H_2O_2 увеличивала выживаемость клеток более чем в 30 раз; увеличение концентрации ИЛК до 10 мМ приводила к увеличению выживаемости *Y. lipolytica* 212 в 280 раз по сравнению с контролем. В литературе имеется сообщение, что аконитат-гидратаза, окисляющая лимонную кислоту до ИЛК, является самым чувствительным ферментом ЦТК к ингибированию H_2O_2 [3]. По-видимому, регуляторное действие добавленной в среду ИЛК заключается в устранении торможения ЦТК, самого мощного процесса энергообеспечения, от которого зависит физиологическое состояние организма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Московской области в рамках научного проекта № 17-48-500446

Литература

1. Morgunov IG et al. Investigation of the effect of biologically active threo-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum* // Prep Biochem Biotechnol. - 2017 - doi: 10.1080/10826068.2017.1381622.
2. Karpukhina OV et al. The effect of antioxidant compounds on oxidative stress in unicellular aquatic organisms // In Materials Science and Engineering, Volume II: Physicochemical Concepts, Properties, and Treatments; Zaikov, G.E., Hagli, A.K., Klodzinska, E., Eds.; Publisher: Apple Academic Press, 2014, pp. 323-329.
3. Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2005. – V. 360. – P. 2335-2345.

Глюкокиназа – ключевой фермент метаболизма запасных углеводов у метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z

Мустахимов И.И.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН
г. Пущино, mii80@rambler.ru

Метанотрофы – физиологическая группа аэробных бактерий, использующих метан в качестве источника углерода и энергии. Облигатные метанотрофы не способны использовать сахара (глюкозу) в качестве ростовых субстратов, поскольку неспособны транспортировать экзогенные сахара в клетку - отсутствуют гены фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы транспорта углеводов (гены *crr*, *ptsI*, *ptsH*, *ptsG* *E. coli*) и неспецифической системы транспорта галактозы (*galP* *E. coli*). Однако, геномы всех метанотрофов класса *Gamma*proteobacteria, *Alphaproteobacteria* (кроме родов *Methylosinus* и *Methylocystis*) и филума *Verrucomicrobia* содержат последовательности, аннотированные как гены глюкокиназы – фермента, катализирующего фосфорилирование глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Свободная глюкоза в клетках метанотрофов возможно образуется при деградации сахарозы (фермент - амилосахараза) или гликогена (амило-1,6-глюкозидаза). Таким образом, мы полагаем, что глюкокиназа ответственна за включение образующейся внутриклеточной глюкозы в основной метаболизм.

Нами были изучены свойства и роль глюкокиназы у модельного галотолерантного метанотрофа *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. Гетерологичной экспрессией гена *glk* был получен гомологичный препарат рекомбинантной глюкокиназы и изучены свойства. Показано, что глюкокиназа (2х35 кДа) – высокоактивный фермент (V_{max} 131 Е/мг) с щелочным оптимумом рН (9,5 – 10), что коррелирует с алкалофильной природой метанотрофа. Активность фермента зависит от двухвалентных металлов Mg²⁺ или Mn²⁺. Глюкокиназа строго специфична к АТФ и глюкозе (K_m АТФ 0.30 и K_m глюкозы 0.21). Продукт реакции АДФ ингибирует активность фермента (K_i АДФ = 2.34). Делеция гена *glk* вызывала замедление скорости роста мутантного штамма на метане и метаноле. У дикого и мутантного штаммов *M. alcaliphilum* 20Z было проанализировано внутриклеточное содержание сахарозы, гликогена, глюкозы и трегалозы. Показано, что содержание свободной глюкозы и трегалозы существенно возрастает у мутанта по глюкокиназе на фоне резкого снижения количества сахарозы и гликогена. Полученные данные свидетельствуют о том, что глюкокиназа выполняет важную функцию в метаболизме сахаров у метанотрофов.

Характеристика продуцентов биоПАВ, выделенных из поверхностных вод и осадков Балтийского моря

Петриков К.В., Ветрова А.А., Иванова А.А., Делеган Я.А., Гафаров А. Б., Соколов С.Л.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,
г. Пущино, bioscience.kp@gmail.com

К биологическим поверхностно-активным веществам (биоПАВ или биосурфактантам) относят обширную группу разнообразных соединений, продуцируемых микроорганизмами и обладающих выраженной поверхностной активностью. Несмотря на непрерывно увеличивающийся поток работ, посвящённых биосурфактантам, остаётся открытым множество вопросов, связанных со свойствами этих веществ, их влиянием на метаболизм бактерий, с их ролью в микробных популяциях, с путями их биосинтеза и со многими другими аспектами. Так что изучение этих вопросов дополняет и расширяет имеющиеся научные знания и носит фундаментальный характер. Практический интерес к биоПАВ обусловлен большими возможностями их применения, что связано с

разнообразием свойств, как физико-химических, так и биологических, и с рядом важных преимуществ перед синтетическими ПАВ: более низкая токсичность, биodeградируемость, возможность использования дешёвого возобновляемого сырья для получения. Биосурфактанты могут найти применение в таких областях промышленности, как нефтедобывающая, пищевая, фармацевтическая.

БиоПАВ обладают высокой неоднородностью как по структурному разнообразию, так и по видам синтезирующих биоПАВ микроорганизмов. Регулярно появляются публикации, посвящённые либо обнаружению нового продуцента биоПАВ, либо описанию биоПАВ нового строения. Как видно, поиск и описание новых биоПАВ, микроорганизмов-продуцентов, изучение их распространённости являются актуальными задачами. Известно, что образование биоПАВ распространено среди микроорганизмов, способных деградировать нефтяные углеводороды. В лаборатории биологии плазмид ИБФМ РАН имеется коллекция из 173 штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из проб донных осадков и поверхностных вод прибрежных районов Балтийского моря. При этом каждая проба отбиралась в загрязнённом, находящемся около порта, районе и в чистом, вдали от каких-либо источников загрязнений. Исходя из этого, целью данной работы явилась характеристика этой коллекции углеводородокисляющих бактерий на предмет способности к образованию биоПАВ.

Каждый штамм из коллекции культивировали в течение пяти суток в минеральной среде Эванса с гексадеканом в качестве источника углерода и энергии, после чего измеряли поверхностное натяжение культуральной среды методом отрыва кольца. В результате для 12 штаммов наблюдалось снижение поверхностного натяжения до 40 мН/м и ниже, что является распространённым критерием отбора продуцентов. Анализ литературных данных говорит о том, что содержание бактерий-продуцентов биоПАВ, получаемое при скрининге различных коллекций микроорганизмов-нефтедеструкторов, колеблется в пределах 10% от общего количества штаммов, из чего можно заключить, что полученная в нашей работе численность продуцентов биоПАВ (около 7%) является типичной для такого рода коллекций. Распределение продуцентов биоПАВ по группам проб оказалось достаточно равномерное: из чистой водной пробы выделено 3 штамма, из загрязнённой — 3, из чистой и загрязнённой проб осадков — 3 и 4 штамма, соответственно

Двумя большими и распространёнными группами биоПАВ являются гликолипиды и липопептиды, которые можно обнаружить методом тонкослойной хроматографии со специфическими проявителями. На наличие этих биоПАВ были проанализированы 12 отобранных штаммов-продуцентов. Культивирование бактерий для наработки биоПАВ производили аналогично вышеописанному. После удаления клеток центрифугированием биоПАВ экстрагировали метил-третбутиловым эфиром, экстракт концентрировали на ротонном испарителе. По результатам хроматографии установлено, что 6 штаммов являются продуцентами гликолипидов, ещё пять — липопептидов, и для одного не было выявлено образования этих биоПАВ. Для дальнейшей характеристики структуры выбрали два штамма, образующих наибольшее количество биосурфактанта (количество оценивали по интенсивности окрашивания хроматограмм): продуцент гликолипидов *Rhodococcus* sp. 66s и продуцент липопептидов *Rhodococcus* sp. 74w.

Определение структуры гликолипидов проводили методом масс-спектрометрии с ионизацией электроспреем в режиме регистрации как положительных, так и отрицательных ионов. Были получены два интенсивных сигнала для аддуктов $[M+Na]^+$ и депротонированных ионов $[M-H]^-$, соответственно. В режиме положительной ионизации также провели фрагментацию каждого ионов. Анализ полученных результатов и их сравнение с ранее опубликованными работами позволяют заключить, что штамм *Rhodococcus* sp. 66s росте на гексадекане образует два основных гликолипида: 2-сукциноил-3,4-октаноил-деcanoил-2'-деканолитрегалозу и 2-сукциноил-3,4-диоктаноил-2'-деканолитрегалозу.

В отличие от трегалозосодержащих гликолипидов, образование липопептидных биоПАВ не является характерным для представителей рода *Rhodococcus*, что затрудняло выбор подходов для анализа липопептидов, образуемых штаммов *Rhodococcus* sp. 74w. В итоге было проведено определение суммарного аминокислотного состава на аминокислотном анализаторе «Сукам» (ФРГ) после кислотного гидролиза. Показано наличие 11 аминокислот: глицина, аланина, треонина, лейцина, цистеина, серина, валина, глутаминовой кислоты, глутамина, аспарагиновой кислоты и аспарагина. Эти аминокислоты встречаются в составе известных липопептидов, продуцируемых микроорганизмами других родов, однако, для родококков известны только липопептиды содержащие, в числе прочих аминокислот, пролин и изолейцин. В полученном нами препарате они не присутствуют в значительных количествах. Это свидетельствует об отличиях в строении биоПАВ, продуцируемого штаммом *Rhodococcus* sp. 74w, от известных липопептидов родококков.

Таким образом, в результате характеристики коллекции углеводородокисляющих бактерий было получено 12 штаммов-продуцентов биоПАВ. Показано, что штамм *Rhodococcus* sp. 66s образует два сукциноилтрегалолипида. Для штамма *Rhodococcus* sp. 74w было показано образование липопептида, предположительно, нового, ранее не описанного строения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, уникальный идентификатор – RFMEFI61615X0038, и РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00610 мол_а.

Изучение электрохимических свойств углеродных волокнистых наноматериалов для создания микробных топливных элементов

Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, plekhanova@ibpm.pushchino.ru

Развитие биотопливных элементов связано с поиском и исследованием свойств новых материалов для создания электродов, обладающих высокой удельной поверхностью, высокой электропроводностью, биосовместимостью. Одними из перспективных материалов для создания электродов являются волокнистые углеродные материалы (УВМ), включающие в себя как нанотрубки, так и нановолокна. Наиболее простым и эффективным способом получения углеродных нановолокнистых материалов является метод электроформования, который позволяет создавать волокна диаметром от 10 нм до 20 и более мкм. Для получения волокнистого углеродного материала первоначально выполняют его термоокислительную стабилизацию (сшивку) в присутствии кислорода воздуха при температуре от 250 до 300 °С, после чего процедуру завершают в атмосфере инертного газа при температуре от 700 до 1500 °С. Варьируя конечную температуру обработки и степень ориентации волокон в материале, возможно достичь электрической проводимости, превышающей 800 См/см. Были получены несколько модификаций УВМ, различающиеся степенью карбонизации, а также условиями получения (температура карбонизации и скорость набора температуры при этом процессе).

Целью работы было сравнение электрохимических свойств некоторых модификаций УВМ при иммобилизации на них бактериальных клеток и фрагментов клеточных мембран в составе микробного топливного элемента.

В качестве прекурсора использовали УВМ (ООО «Ниагара», г. Москва), который состоял из микроскопических волокон диаметром 15.2 мкм. Обозначен как материал 1. Материал 2 отличался тем, что при его получении карбонизация проводилась в среде N₂ при 1000°C. В случае материала 3, процесс проводился уже при температуре 1100°C.

Материал 4 был получен при температуре 1000°C, но при этом скорость набора температуры была выше, чем в случае материала 2.

Электрохимические свойства биоэлектродов из УВМ были проверены с помощью метода электрохимической импеданной спектроскопии как по трех-, так и по двухэлектродной схеме. В качестве медиатора электронного транспорта для анода использовался ДХФИФ (80 мкМ), в случае двухэлектродной схемы в катодное отделение добавляли ГЦФ (4 мМ). Электрохимические параметры материалов изучали как при иммобилизации на них целых бактериальных клеток *G. oxydans sbsp. industrius* ВКМ В-1280, так и их мембранных фракций. Полученные данные представлены в таблице.

Табл. Электрохимические характеристики биоэлектродов из УВМ с иммобилизованными клетками либо мембранными фракциями *G. oxydans*, полученные при измерениях по двух- и трехэлектродным схемам.

Биокатализатор	Целые клетки <i>G. oxydans</i>			Мембранные фракции <i>G. oxydans</i>		
	Трехэлектродная, U=200 мВ		Двухэлектродная, U=-150 мВ	Трехэлектродная, U=200 мВ		Двухэлектродная, U=-150 мВ
Схема измерения	R _A до добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²	R _A до добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²	R _A после добавления субстрата, Ом см ²
Материал электрода						
УВМ 1	6809.00	1158.00	1503.00	13170	1621.00	2629.00
УВМ 2	18880.00	1385.00	1556.00	4350	495.70	928.80
УВМ 3	11050.00	1814,00	2188.00	8298	631.10	2467.00
УВМ 4	7387.00	674.30	601.30	5476	655.00	2791.00

Как видно из таблицы, для всех материалов введение субстрата в ячейку вызывало резкое падение сопротивления в 6-10 раз. Наименьшее сопротивление, как по двухэлектродной, так и по трехэлектродной схеме, наблюдали у биоэлектрода на основе УВМ 4, в то время как наибольшее сопротивление было у электрода УВМ 3.

Следует отметить, общее уменьшение значений сопротивления анода при переходе от целых клеток к мембранным фракциям еще до добавления субстрата, что можно связать с меньшим размером биообъекта и с нарушением его клеточных мембран, обладающих высоким сопротивлением. Тенденция уменьшения сопротивления сохранилась для всех электродов (кроме УВМ 1) и при добавлении субстрата, однако при переходе к двухэлектродной схеме 3 из 4 электродов показали сильно увеличенные значения сопротивления анода, что можно связать с малой устойчивостью УВМ под воздействием жидкости. В результате лишь УВМ 2 обладал стабильно низким сопротивлением как при измерениях по трехэлектродной схеме, так и по двухэлектродной.

В результате, как наиболее удачные модификации можно выделить УВМ 2 и УВМ 4, что делает их наиболее перспективными для использования в БТЭ как на основе целых клеток бактерий, так и на основе их мембранных фракций.

Также были получены циклические вольтамперограммы для каждого типа биоэлектрода на основе УВМ. Вычисленные из ЦВА мощностные характеристики электродов на основе бактериальных клеток и их мембранных фракций показаны на рис. 1 и рис. 2, соответственно. Максимальная мощность соответствовала материалу 2 (8 мкВт/см²), минимальная - материалу 1 (2.4 мкВт/см²) для обоих типов биокатализаторов.

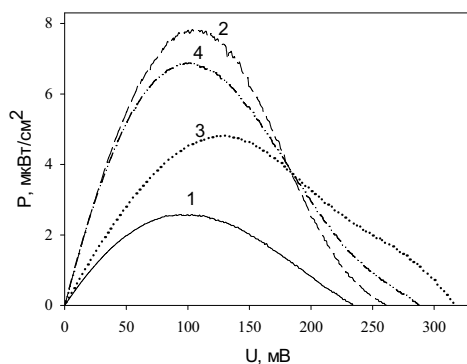


Рис. 1. Мощностные характеристики электродов на основе УВМ с иммобилизованными бактериальными клетками. Цифрами обозначены виды УВМ.

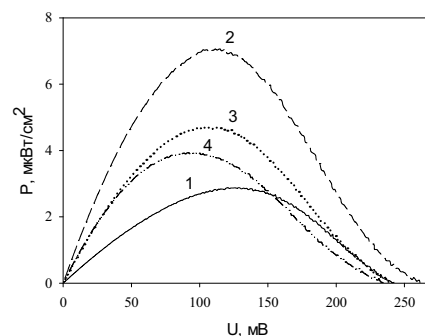


Рис. 2. Мощностные характеристики электродов на основе УВМ с иммобилизованными мембранными фракциями бактериальных клеток. Цифрами обозначены виды УВМ.

Таким образом, условия получения УВМ влияют на электрохимические свойства биоэлектродов на основе этих материалов. Лучшие параметры (минимальное сопротивление и высокая мощность) были получены для материала карбонизацию которого проводили при температуре 1000°C и при замедленной скорости набора температуры, что делает этот материал перспективным для применения в БТЭ и биосенсорах.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований, грант № 15-29-01292 ОФИ_М_2015.

Получение фармацевтической субстанции такролимуса: полный цикл биосинтеза и очистки

Пошехонцева В.Ю.^{1,2}, Фокина В.В.², Салионов Д.С.³, Шутов А.А.², Донов М.В.²

¹ФГБОУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт»

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушино

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»
rikahameleon@mail.ru

Такролимус (FK-506) – 23-членный макролидный лактон, содержащий α,β -дикетоамидную группировку, является вторичным метаболитом, продуцируемым стрептомицетами определенных видов. Такролимус занимает одно из ведущих мест по широте клинического применения, используется в иммуносупрессивной терапии для предотвращения отторжения трансплантата, в качестве препарата против злокачественных новообразований, антифунгального агента, нейропротектора, для лечения аутоиммунных заболеваний и др. и спектр его применения постоянно расширяется [1].

Основными и самыми существенными недостатками известных технологий микробиологического синтеза такролимуса являются низкая продуктивность и низкая селективность штаммов-продуцентов, а также дорогостоящая и сложная процедура выделения и очистки продукта до фармакопейной чистоты.

Целью настоящей работы являлась разработка технологии полного цикла для получения фармацевтической субстанции такролимуса. В рамках заявленной цели был поставлен ряд задач: 1) селекция высокоактивного штамма-продуцента такролимуса, изучение его свойств и отработка условий его поддержания в стабильном состоянии; 2) проведение комплекса исследований ферментационных сред и оптимизация режима

ферментации; 3) разработка схемы и оптимизация условий выделения и очистки с получением субстанции фармакопейного качества.

В работе был использован штамм *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д, обеспечивающий титр такролимуса 600-800 мг/л [2, 3].

Определены критерии селекции наиболее активных морфотипов штамма. Наиболее продуктивный морфотип представлен интенсивно окрашенными кирпично-оранжевыми колониями округлой формы, до 7 до 13 мм в диаметре, с выраженной структурной дифференциацией поверхности. Отработаны условия поддержания высокой биосинтетической активности данного морфотипа. Эффективным способом поддержания штамма является хранение культуральной жидкости в равных долях с 50%-ым глицерином при -70°C .

Оптимизацию условий культивирования штамма проводили на основе зависимости целевой биосинтетической активности от состава питательных сред и параметров культивирования. Биосинтез такролимуса наиболее эффективно осуществляется на комплексных средах, которые, как правило, включают в качестве источников углерода моно-, ди- и полисахариды, а также органические кислоты; в качестве источников азота – кукурузный, дрожжевой экстракты, гидролизаты казеина, аминокислоты; непосредственными предшественниками синтеза FK-506 являются ацетат, пропионат, бутират, метионин, пипеколиновая и шикимовая кислоты [4-6]. Нами установлено, что предпочтительными источниками углерода являются длинноцепочечные углеводы – крахмалы (преимущественно картофельные), а также продукты их частичного гидролиза. В качестве источника азота наибольший положительный эффект на биосинтез такролимуса показан для кукурузного экстракта. Активный биосинтез наблюдался при добавлении в среду целых клеток пекарских дрожжей. Показано стимулирующее действие солей марганца и некоторых аминокислот. Добавление в среду для биосинтеза амберлитного сорбента XAD-7 предотвращает деградацию такролимуса культурой-продуцентом.

Оптимальными условиями культивирования являются температура $24-25^{\circ}\text{C}$, рН 6,8-7,5 и высокая аэрация при продолжительности биосинтеза 10-12 суток.

Разработана схема выделения и очистки такролимуса, позволяющая получать субстанцию фармакопейной чистоты (99,8%) с выходом более 50%, а также найдены условия, позволяющие отделить близкородственные аналоги от такролимуса (финишная очистка) в условиях сорбционной очистки (рис. 1). Показано, что на стадии выделения такролимуса из культуральной среды и предварительной очистки могут быть использованы регенерируемые сорбенты. Установлено, что сульфокатиониты на основе силикагеля, модифицированные ионами серебра, обеспечивают отделение близкородственных аналогов (аскомицина и дигидротакролимуса) при увеличении производительности в 10-20 раз.

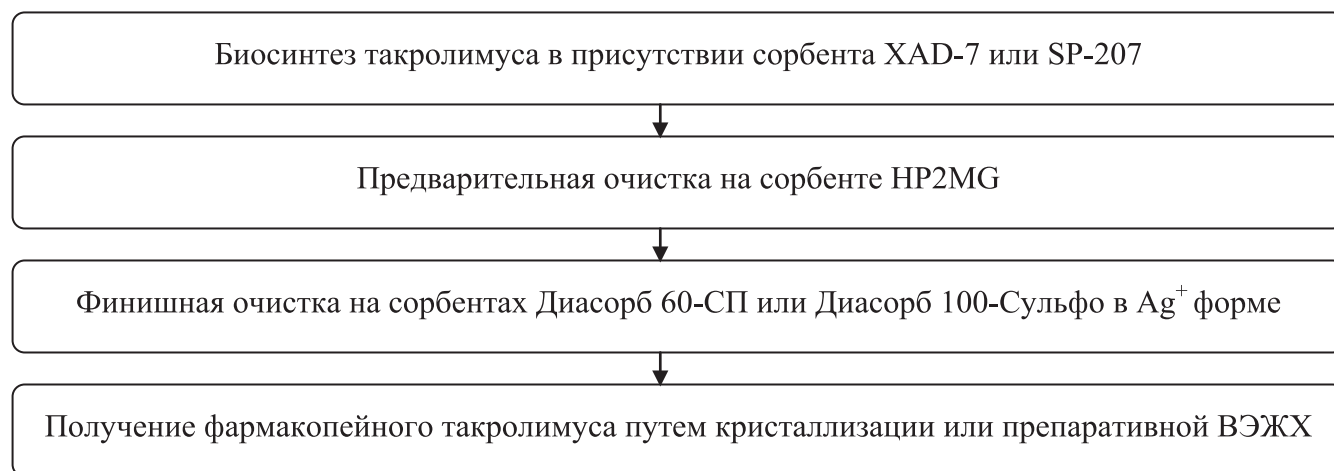


Рис.1. Общая схема очистки такролимуса

Полученные данные могут быть использованы при создании промышленной технологии для получения фармацевтической субстанции такролимуса.

Литература

1. Barreiro C., Martínez-Castro M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506) // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 98 (2). P. 497-507.
2. Патент РФ №2495937, 2012.
3. Пошехонцева В.Ю., Гулевская С.А., Донова М.В. Сравнительное изучение фенотипических характеристик и идентификация штаммов *Streptomyces* spp. – продуцентов такролимуса // *Журнал научного фонда «Биолог»*. 2014. Т. 3. С. 119-122.
4. Byrne K.M., Shafiee A., Nielsen J.B., Arison B., Monaghan R.C., Kaplan L. // *The biosynthesis and enzymology of an immunosuppressant, immunomycin, produced by Streptomyces hygroscopicus var ascomyceticus: Developments in Industrial Microbiology*. Iowa: Wm. C. Brown Publisher, 1993. P. 29-47.
5. Kojima I., Cheng Y.R., Mohan V., Demain A.L. Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* // *J. Ind. Microbiol.* 1995. V. 14 (6). P. 436-439.
6. Nielsen J.B., Hsu M-Jo, Byrne K.M., Kaplan L. Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of piperolate incorporation // *J. Biochem.* 1991. V. 30 (23). P. 5789-5796.

Потребление лактата пропионовокислыми бактериями в условиях рубца крупного рогатого скота

Рыжманова Я.В., Автух А.Н., Щербакова В.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
РАН, г. Пушино, ryzhmanova@gmail.com

Ацидоз крупного рогатого скота (КРС) является опасным и распространенным заболеванием, наносящим серьезный ущерб молочной отрасли сельского хозяйства. Развитие заболевания происходит вследствие снижения кислотности содержимого желудка из-за применения несбалансированных кормов. Применяющиеся в настоящее время меры борьбы с развитием ацидозных состояний КРС сводятся к введению в кормовые смеси буферных компонентов и являются малоэффективными. Решением проблемы лечения и профилактики этого заболевания может стать введение в кормовые смеси жвачных животных микроорганизмов, утилизирующих лактат, накопление которого и определяет снижение pH рубца. В литературе до сих пор нет точного порогового значения pH для диагностирования ацидоза рубца. Предполагается, что ацидоз развивается при снижении pH рубца ниже 5.6 (Gozho et al., 2007), 5.8 (Beauchemin et al., 2003) или 6.0 (Stone, 2004) на протяжении не менее 3-5 часов. Известно, что бактерии родов *Propionibacterium* (Petri et al., 2013), *Megasphaera* (Marchandin et al., 2009), *Selenomonas* (Bryant, 1956), *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* (Cummins et al., 1995) способны потреблять лактат и, по данным метагеномных исследований, являются естественной микрофлорой рубца коров и овец. Наиболее перспективным объектом для борьбы с ацидозом коров могут стать представители рода *Propionibacterium*. Помимо поддержания нормальных значений pH рубца путем утилизации лактата, эти бактерии образуют в качестве метаболитов витамины группы B, в том числе фолиевую кислоту и витамин B₁₂ (Hugenholtz, 2002), бифидогенные факторы (Warminska-Radiko et al., 2002), полипептиды, обладающие антимикробными (Holo et al., 2002) и антимуtagenными свойствами (Vorobjeva, 2000), а также пропионат и ацетат, необходимые для нормальной

лактации коров. В российских коллекциях бактерии рода *Propionibacterium* представлены в основном промышленными штаммами для производства сыров и имеют оптимумы роста при pH 7.0 и температуре 28-30°C.

Целью данной работы стала проверка способности штаммов *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ВКМ Ас-2093 и Ас-2094, выделенных из сыра, эффективно потреблять лактат при значениях pH 5.5-6.0 и температуре 37°C, что соответствует условиям ацидоза рубца КРС. Потребление лактата определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Проведенные исследования показали, что штамм Ас-2093 через 48 часов культивирования в жидкой среде при температуре 37°C и начальном содержании в ростовой среде лактата 152 мМ полностью утилизировал лактат в диапазоне pH 5.5-7.0 (Рисунок 1 а). При температуре 37°C штамм Ас-2094 утилизировал от 11 до 56% лактата, в то время как при росте в оптимальных для этого штамма условиях (30°C и pH 6.5-7.0) также наблюдалась полная утилизация субстрата (Рисунок 1 б).

Известно, что при остром ацидозе содержание молочной кислоты в рубце составляет 50-120 мМ. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ВКМ Ас-2093 полностью утилизировал лактат в количестве 152 мМ в течение 48 часов. Таким образом, штамм *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ВКМ Ас-2093 может полностью потреблять образующуюся в рубце молочную кислоту и эффективно использоваться как в целях профилактики, так и для лечения ацидоза КРС.

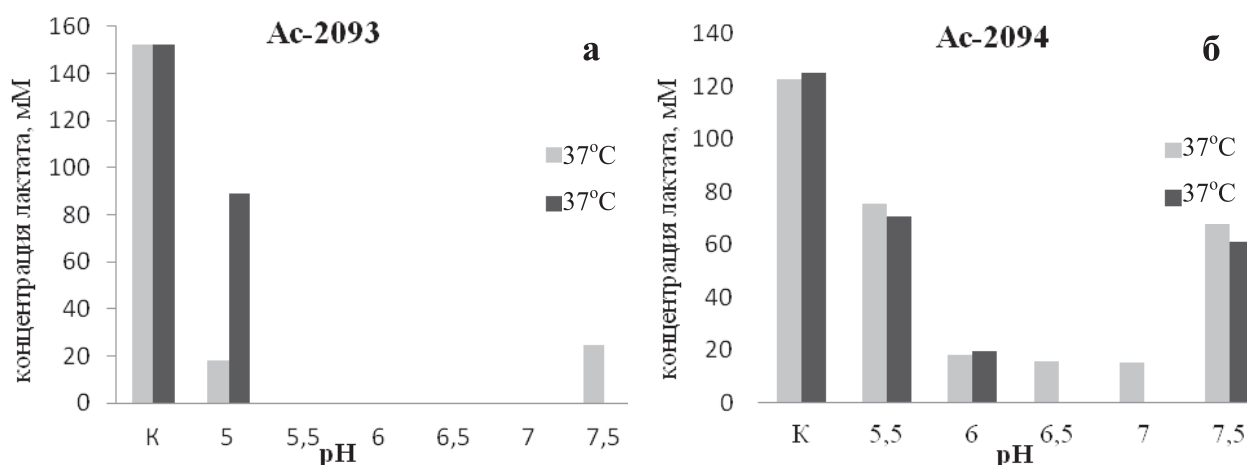


Рис. 1. Содержание лактата в ростовой среде после 48 часов культивирования *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* Ас-2093 (а) и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* Ас-2094 (б) при разных значениях pH и температурах культивирования. К – начальное содержание лактата в ростовой среде.

Благодарности. Авторы благодарят с.н.с., к.б.н. Дорофееву Л.В. за предоставление штаммов *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ВКМ Ас-2093 и Ас-2094 для исследований.

Литература

1. Beauchemin K.A., Yang W.Z., Rode M.L. Effects of particle size of alfafa-based dairy cow diets on chewing activity, rumen fermentation, and milk production // Journal of Dairy Science. 2003. V. 86. p. 630-643.
2. Bryant M.P. The characteristics of strains of *Selenomonas* isolated from bovine rumen contents // Journal of Bacteriology. 1956. V. 72. p. 162-167.
3. Coleman G.S. A sulfate-reducing bacterium from the sheep rumen // J. Gen. Microbiol. 1960. V.22. p. 423-436.
4. Cummings B. A., Caldwell D.R., Gould D.H., Hamar D.W. Identity and interactions of rumen microbes associated with dietary sulfate-induced polioencephalomalacia in cattle // American journal of veterinary research. 1995. V.56. №10. p. 1384-1389.

5. Gozho G.N., Krause D.O., Plaizier J.C. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows // Journal of Dairy Science. 2007. V. 90. p. 856-866.
6. Holo H., Faye T., Brede D.A., Nilsen T., Ødegård I., Langsrud T., Brendenhaus J., Nes I.F. Bacteriocins of propionic acid bacteria // Le Lait. 2002. V. 82. p. 59-68.
7. Hugenholtz J., Hunik J., Santos H., Smid E. Nutraceutical production by propionibacteria // Le Lait. 2002. V. 82. p. 103-112.
8. Marchandin H., Juvonen R. & Haikara A. Genus XIII. *Megasphaera* / In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, V.3. The *Firmicutes*. In: Vos P., Garrity G.M., Jones D. et al. (eds). New York: Springer. 2009. p. 1082-1089.
9. Petri R.M., Schwaiger T., Penner G.B., Beauchemin K.A., Forster R.J., McKinnon J.J. et al. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. p. 3744-3755.
10. Stone W.C. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle // Journal of Dairy Science. 2004. V. 87 (E. Suppl.). E12-E26.
11. Vorobjeva L. Physiological peculiarities of propionibacteria present facts and prospective applications // Science Progress. 2000. V. 83. № 3. p. 277-301.
12. Warminska-Radiko I., Laniewska-Moroz L., Babuchowski A. Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibacteria // Le Lait. V. 2000. 82. № 1. p. 113-121.

Ингибирование роста и миграции раковых клеток полимерами гентиизиновой кислоты

*Рыццов Г. К.^{1,2}, Лисов А. В.¹ Леонтьевский А. А.¹,
Земскова М. Ю.^{1,2}*

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, rta@ibpm.pushchino.ru

²Государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области
Московский государственный областной университет,
Научно-образовательный центр, г. Пущино

Рак - это сложное, динамически развивающееся заболевание, представленное более чем 200 известными типами и формами. Каждая из них требует индивидуального подхода и набора медикаментов. Именно поэтому разработка противораковых препаратов задействует все возможные источники, в том числе и использование биологически активных веществ растительного происхождения.

Целью данной работы являлось исследование влияния на опухолевые клетки лигнин-подобных полианионных полимерных соединений. Для тестирования были выбраны полимеры: 2,5-дегидробензойной кислоты (гентиизиновой кислоты), 2,5-дегидробензойной кислоты, комбинированной с желатином и 3,4,5-тригидробензойной кислоты (галловой кислоты), синтезированные путем окисления фенольных соединений под действием лакказы из *Trametes versicolor*. В экспериментах использовались линии клеток рака предстательной железы (LNCaP, DU145) и рака мочевого пузыря (T24). Для оценки влияния предполагаемых ингибиторов на размножение раковых клеток, клеточные культуры обрабатывались лигнин-подобными полимерами в концентрации 25, 50 и 100 мкг/мл в течение 72 часов. Эффективность пролиферации оценивалась по измерению оптической плотности клеточных культур окрашенных кристаллическим фиолетовым. Миграция раковых клеток была изучена с применением двух различных методов: «scratch assay» и «boyden chamber assay», где эффективность миграции в присутствии исследуемых соединений и контрольной группы оценивалась путем подсчета мигрировавших клеток.

Результаты показывают, что полимер гентизиновой кислоты имеет наиболее выраженный концентрационно-зависимый эффект на размножение клеток LNCaP, где наблюдалось снижение скорости пролиферации на 40% при максимальной концентрации ингибитора. Реакция клеток DU145 и T24 значительно менее выражена. Анализ клеточного цикла методами проточной цитометрии клеток LNCaP было установлено, что полимер гентизиновой кислоты частично блокирует цикл клеточного деления в фазе G1. Также было показано, что полимеры гентизиновой кислоты и гентизиновой кислоты в сочетании с желатином на 90% ингибируют миграционную активность клеток LNCaP и T24. Полимер галловой кислотой не оказывает статистически значимого эффекта. Эти данные указывают, что разные производные бензойных кислот в виде полианионных полимеров обладают дифференцированной биологической активностью на размножение и миграцию опухолевых клеток.

Для определения молекулярных механизмов ингибирования был использован Proteome Profiler Human Phospho-RTKArrayKit (R&Dsystems), определяющий уровень активации 49 рецепторных с тирозиновых киназ и исследована активация сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, контролирующего клеточный цикл и миграцию клеток. Результаты показывают, что полимеры гентизиновой кислоты вызывают дисрегуляцию экспрессии клеточных киназ, что, возможно, приводит к наблюдаемому эффекту блокирования клеточного цикла и миграции опухолевых клеток.

Особенности динамики титра колифагов нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни

¹Скобликов Н.Э., ¹Осепчук Д.В., ¹Москаленко Е.А., ¹Авдиенко В.В., ²Зимин А.А.

¹ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства
г. Краснодар; skoblikow@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

Исследованы особенности динамики титра колифагов (бактериофагов *E.coli*) нормофлоры 15 цыплят в возрасте от 4 до 38 дней. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 6-кратно с интервалом 6-8 дней. Всего было отобрано и исследовано 90 проб.

После отбора пробы взвешивались, ресуспендировались в буферном растворе с добавлением ингибиторов бактериального роста, после чего центрифугировались. Из супернатанта делали серию 100-кратных разведений, из которых производили высев на культуры лабораторных штаммов *E. coli* B и BL 21 методом агаровых слоёв. После подсчёта образовавшихся бляшек титр фагов в образце рассчитывали в lg БОЕ/мл.

Из 90 проб бактериофаги выделялись в доступном для детекции титре на культуре *E. coli* BL 21 лишь в 36 пробах. При этом фаги выделялись в возрасте в возрасте 4 дней у 9 птиц, в возрасте 10-18 дней – всего у 1 птицы, в возрасте 24 дней – у 6 птиц, в возрасте 31 дня – у 10 птиц, в возрасте 38 дней – у 10 птиц. Наибольшие показатели содержания колифагов отмечались в первый же возрастной период (в возрасте 4 дней), колеблясь в возрасте 3 дней в пределах от 3,1 до 5,6 lg БОЕ/г. Затем отмечалось критическое падение до неопределяемых значений к возрасту 10-18 дней. После этого отмечался подъём титра до значений 0,2 – 0,9 lg БОЕ/г к 31-дневному возрасту и до 3,7 – 5,5 lg БОЕ/г к 38-дневному возрасту.

В результате исследования получена общая характеристика динамики титра колифагов у цыплят первых 6 недель жизни, что представляет собой новые данные, полезные для общего понимания становления нормофлоры птиц в онтогенезе, её

биоразнообразия и для определения критических периодов развития при применении ветеринарных препаратов и кормовых добавок.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 16-44-230855-р_а.

Особенности динамики титра коли-титра нормофлоры цыплят в первые шесть недель жизни

¹Скобликов Н.Э., ¹Осепчук Д.В., ¹Москаленко Е.А., ¹Авдиенко В.В., ²Зимин А.А.

¹ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства
г. Краснодар; skoblikow@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

Исследованы особенности динамики *E.coli* (коли-титра) нормофлоры 15 цыплят в возрасте от 4 до 38 дней. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 6-кратно с интервалом 6-8 дней. Всего было отобрано и исследовано 90 проб.

После отбора пробы взвешивались, ресуспендировались в буферном растворе. Из супернатанта производили высев на селективную среду Эндо, посев инкубировался при 37°C в течение 24 ч. После подсчёта образовавшихся колоний коли-титр в образце рассчитывали в lg КОЕ/мл. Дальнейшую идентификацию штаммов *E.coli* проводили по спектру биохимических признаков и по составу жирных кислот, определяемых на газовом хроматографе *Agilent Technologies*.

Отмечалось снижение высеваемости *E.coli* в доступном для детекции титре на среде Эндо в возрастном диапазоне 17-38 дней: так, в возрасте 17 дней штаммы *E.coli* выделялись лишь у 4 из 15 птиц, в возрасте 24 дней – у 7 из 15 птиц, в возрасте 31 дня – у 6 из 15 птиц, а в возрасте 38 дней – у 9 птиц. Показатели титра *E.coli* у цыплят демонстрировали определённую динамику, колеблясь в возрасте 4 дней в пределах от 3,0 до 4,2 lg КОЕ/г; в возрасте 17 дней – от 2,0 до 3,9 lg КОЕ/г; в возрасте 31 дня – от 1,7 до 2,6 lg КОЕ/г. Таким образом, отмечалось снижение коли-титра у цыплят в возрасте 4 – 31 дня.

В результате исследования получена общая характеристика динамики титра *E.coli* у цыплят первых 6 недель жизни, что представляет собой новые данные, полезные для общего понимания становления нормофлоры птиц в онтогенезе, её биоразнообразия и для определения критических периодов развития при применении ветеринарных препаратов и кормовых добавок.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 16-44-230855-р_а.

Доля фагов Т4-типа среди колифагов нормофлоры гусят в первые семь недель жизни

¹Скобликов Н.Э., ¹Осепчук Д.В., ¹Москаленко Е.А., ¹Авдиенко В.В., ²Зимин А.А.

¹ФГБНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт животноводства,
г. Краснодар; skoblikow@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

Колифаги (бактериофаги *E.coli*) выделенные из нормофлоры 10 гусят в возрасте от 3 до 47 дней, исследованы на наличие генетических маркеров, характерных для фагов Т4-типа семейства *Myoviridae*. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 12-кратно с интервалом 3-6 дней. Всего было отобрано и исследовано 120 проб, из которых фаги

выделялись в доступном для детекции титре на культуре *E. coli* BL 21 лишь в 45 пробах. Всего было отобрано 68 фагов, характеризующихся морфологическим разнообразием бляшек.

Молекулярно-генетическую характеристику бактериофагов осуществляли с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специальными праймерами, позволяющими выявить наличие характеристических для фагов Т4-типа семейства *Myoviridae* генетических маркеров. К таким маркерам относятся ген 23, кодирующий основной белок головки фага (праймеры *MZial* и *Cap8*) и ген 32 (праймеры *FR60* и *FR61*) (табл. 1).

Табл. 1

Праймеры, использовавшиеся для молекулярно-генетической характеристики бактериофагов

№	Праймер	Последовательность	Длина	T _m , °C
1	<i>MZial</i>	5'-TGTTATIGGTATGGTICGICGTGCTAT-3'	27	60,5
2	<i>Cap8</i>	5'-TGAAGTTACSTTCACCACGACCGG-3'	24	62,8
3	<i>FR60</i>	5'-CGTAAATCTACTGCTGAACTCGC-3'	23	54,9
4	<i>FR61</i>	5'-GAATGCATCCAAATCATCAGCCAC-3'	24	58,9

Для проведения ПЦР готовили смесь следующего состава:

Буфер В305 1,5 мкл
 MgCl₂ (200mM) 0,15 мкл
 dNTP* (25 mM) по 0,15 мкл каждого
 Праймеры по 5 пмоль на пробу
 ДНК-полимераза *Taq*** по 0,4 мкл
 Н₂О деионизованная до 15,0 мкл
 * - дезоксирибонуклеозидтрифосфаты
 ** - вносили *ex tempore*

В каждую пробирку вносили по 14,8 мкл смеси и по 0,2 мкл пробы, содержащей фаг. ПЦР проводили на амплификаторе *Bio-Rad MJ Mini* по следующей программе:

1. предварительная денатурация при 94°C в течение 90 с;
2. 2 цикла: - денатурация – 94°C, 45 с; - отжиг — 61°C* (56°C)**, 60 с; - элонгация – 72°C, 120 с;
3. 28 циклов: - денатурация – 94°C, 15 с; - отжиг — 61°C* (56°C)**, 30 с; - элонгация – 72°C, 45 с.

* - для праймеров *MZial* и *Cap8*

** - для праймеров *FR60* и *FR61*

После окончания амплификации полученную ДНК разделяли электрофоретически в 1,2% агарозном геле, приготовленном на *TBE*-буфере следующего состава:

Трис 50 mM
 Борная кислота 50 mM
 ЭДТА 5 mM
 pH 8,3

Электрофорез проводили в горизонтальной ванночке (130x270x80 мм), в течение 40-60 мин при напряженности электрического поля 10-20 В/см. В лунки вносили по 2 мкл проб, предварительно смешивая с сигнальными красителями: бромфеноловым синим и ксиленцианолом. По окончании электрофореза гели с разделенной ДНК окрашивали в течение 15 мин в водном растворе бромистого этидия (2 мкг/мл). Фотографирование

получившихся фрагментов проводили фотоаппаратом «Kodak EDAS 290» (экспозиция 6 с) в проходящем жёстком ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм).

По результатам ПЦР-анализа выяснилось, что среди 68 бактериофагов только 28 положительны по гену 23, из которых 25 положительны по гену 32. При этом T4-подобные фаги не выделялись в возрасте 12, 37, 40 и 47 дней, а их наибольшая доля среди всех выделенных колифагов отмечалась в возрасте 6-9 и 15 дней.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 16-44-230855-р_а.

Динамика роста, синтеза липидов и пальмитолеиновой кислоты у дрожжей *Debaryomyces globosus* ВКМ Y-9539

Степанова Н.Н., Миронов А.А., Моргунов И.Г.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино, nadinka_1994@mail.ru

Пальмитолеиновая кислота (ПОК) относится к омега-7 группе мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК). ПОК является мощным природным антиоксидантом, обладает выраженным антимикробным действием в отношении целого ряда патогенных микроорганизмов, применяется при лечении и профилактики социально значимых заболеваний (диабет, нарушение обмена веществ, заболевания сердечно-сосудистой системы, онкогенез и др.), смягчает течение воспалительных процессов, улучшает состояние кожи, волос и ногтей. Растительные масла, богатые этой кислотой, служат ценным сырьём для производства химических соединений и биодизельного топлива. Благодаря своим свойствам ПОК находит применение в различных областях: медицина, фармакология, косметология, пищевая и техническая промышленность, сельское хозяйство. В настоящее время ПОК получают из природных источников – растительных масел и животных жиров. Высокий спрос на ПОК диктует необходимость поиска новых альтернативных источников получения ПОК [1-2]. Скрининг дрожжевых штаммов, имеющихся в коллекции лаборатории аэробного метаболизма микроорганизмов ИБФМ РАН, показал, что штамм *Debaryomyces globosus* ВКМ Y-9539 обладает способностью синтезировать липиды с значительным содержанием ПОК [2].

Целью настоящей работы было исследование динамики роста, синтеза липидов и ПОК у селекционированного штамма *D. globosus* ВКМ Y-9539 в ферментёре в условиях периодического культивирования.

Дрожжи культивировали в 10-л ферментёр АНКУМ-2М в условиях лимитирования роста азотом при избытке глюкозы. Перемешивание осуществлялось турбинной мешалкой, скорость вращения была 800 об/мин. Температура культивирования 28°C и pH среды 5,5 в процессе культивирования поддерживались автоматически. Дополнительные добавки глюкозы вносили порциями (по 20 г/л) в момент повышения pO_2 на 5–10% в сравнении со стабильным уровнем насыщения кислородом (55–60%), которое указывало на полное потребление глюкозы. Каждые 12 часов производили отбор проб. Общая продолжительность культивирования составила 96 ч.

Как показано на рис. 1, на кривой роста можно четко различить экспоненциальную фазу (до 36 ч), фазу замедленного роста (36-48 ч) и стационарную фазу (с 48 ч). В фазе активного роста происходило увеличение содержания липидов с 9,2 до 16% (от а.с.б.); в фазе замедленного роста и стационарной фазе клетки продолжали синтезировать липиды (15-18% от а.с.б.). Доля ПОК в липидах была максимальной (26–27% от суммы жирных кислот) в экспоненциальной фазе и снижалась до 21% (от суммы жирных кислот) в стационарной фазе.

Продуктивность процесса образования ПОК увеличивалась в ходе культивирования *D. globosus* и была максимальной (925 мг/л) на 84 ч, выход ПОК от потреблённой глюкозы по массе ($Y_{ПОК/S}$) при этом составлял 0,4% (рис. 2).

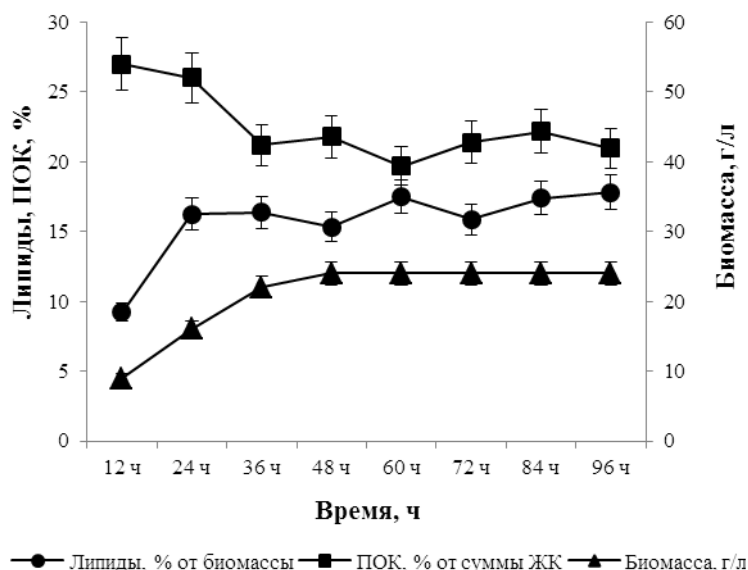


Рис. 1. Динамика роста, накопления липидов в биомассе и содержания ПОК в липидах у *D. globosus*

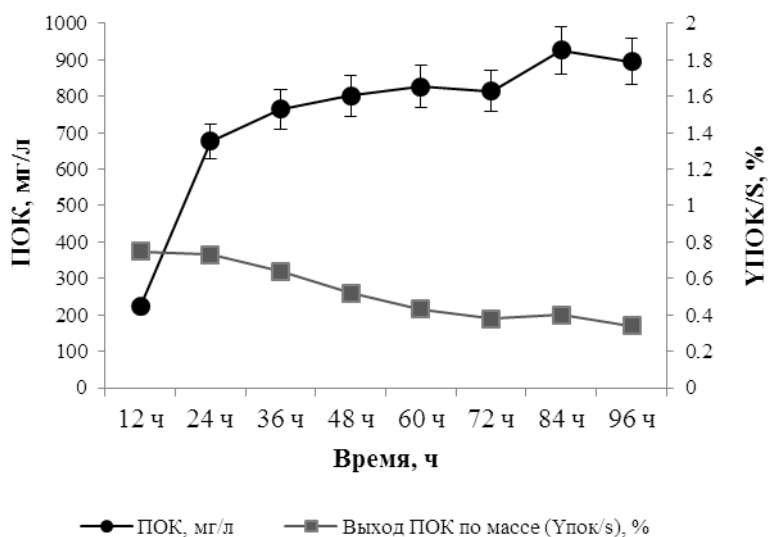


Рис. 2. Динамика образования ПОК и выхода ПОК по массе ($Y_{ПОК/S}$) у *D. Globosus*

Литература

1. Kolouchová I et al. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid //Bioresource technology. – 2015. – V. 192. – P. 726-734.
2. Степанова Н.Н., Моргунов И.Г. Селекция перспективного продуцента пальмитолеиновой кислоты //Сборник тезисов «Физико-химические направления физико-химической биологии и биотехнологии», Из-во: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2017. – С. 151.

Одностадийный микробиологический процесс получения тестостерона из фитостерина

Суходольская Г.В.¹, Карпов М.В.^{1,2}, Николаева В.М.¹, Шутов А.А.¹, Фокина В.В.¹, Стрижов Н.И.¹, Донов М.В.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

²ФГБОУ ВО «Пущинский государственный естественно-научный институт»
sukhodolskaya@rambler.ru

Тестостерон (ТС, андрост-4-ен-3-он-17-ол), представляет группу андрогенных стероидных соединений, участвующих в регуляции гормонального уровня высших организмов и контролирующих развитие репродуктивных органов. Обладает анаболическими эффектами: участвует в росте скелета, регулирует плотность костей и мышечную массу, вызывает задержку азота, фосфора, калия, серы, необходимых для синтеза белка. ТС также является одним из важных предшественников в синтезе многих других важных стероидных препаратов [1].

В связи с оказываемым физиологическим эффектом тестостерон востребован и широко используется в медицинской практике. В этой связи задача создания экологически безопасного, экономичного, высокоэффективного одностадийного микробиологического способа получения ТС актуальна. В настоящее время, при реализации известных одностадийных способов получения ТС нагрузка природных стероидов в большинстве случаев не превышает 1.0 г/л [2].

Цель – оптимизация одностадийного микробиологического процесса получения тестостерона с участием сапрофитных штаммов *Mycobacterium*.

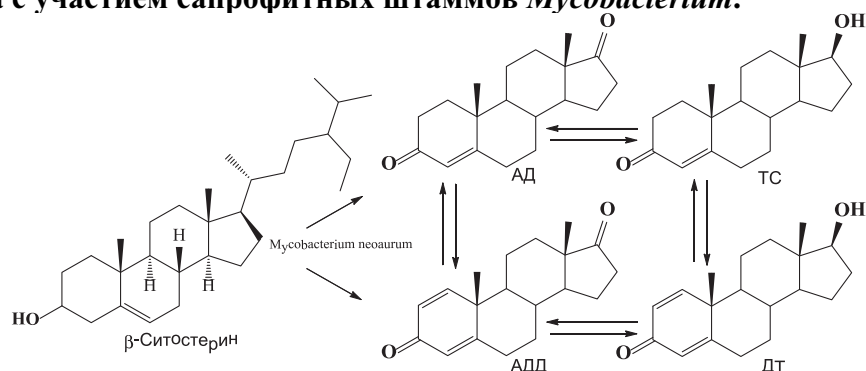


Рис. 1. Схема биохимических реакций конверсии фитостерина в тестостерон

Процесс микробиологической конверсии фитостерина (ФС) в ТС включает поступление фактически нерастворимого субстрата (растворимость в воде не более чем 1 мкМ) в клетку; полиферментный процесс деструкции боковой цепи стерина до андрост-4-ен-3,17-диона (АД) или андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) (рис.1), который катализируется 4 группами катаболических ферментов: системой β -окисления жирных кислот, ω -оксидазной, метил-кротонил-СоА системой карбоксилирования и пропионил-СоА карбоксилазной системой, активно протекающий в условиях интенсивного перемешивания среды; НАДН зависимый процесс восстановления кето-группы при С17 АД (АДД) с участием бифункциональной 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы/редуктазы (17 β -ГСД); побочные ферментативные реакции и деструкцию стероидного ядра [3].

Использовали соевый ФС (β -ситостерин-42.39%, кампастерин-23.48%, стигмастерин-26.08%, брассикастерин-3.52%, сумма стероидов – 95.47%). Микроорганизмы: *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1815Д, *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816Д.

Локализация 17 β -ГСД. Исследование ферментативной активности *in vitro* фракций *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д, 1816Д показало, что 17 β -ГСД характеризуется внутриклеточной локализацией и является НАДН зависимым ферментом.

Оптимизация состава питательной среды и условий конверсии фитостерина.

На основе проведенного скрининга источников углерода, азота, минеральных солей была сконструирована питательная среда, включающая кукурузный экстракт, полножирную соевую муку, глюкозу, минеральные соли, обеспечивающая активный рост микроорганизмов и скоординированную во времени конверсию ФС. Введение в среду неионогенного ПАВ – сахарозы пальмитат-стеарата (СПС) и метилированного производного β -циклодекстрина (мЦД) способствовало дисперсному распределению ФС в среде и обеспечивало высокую скорость его конверсии. В условиях интенсивной аэрации (окислительный режим) выход целевого продукта – АД, предшественника ТС, при конверсии ФС (20 г/л) штаммом *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д составил 72.72-74.81 моль%. Среди сопутствующих продуктов конверсии ФС ТС обнаруживался в следовых количествах (1,43 моль%). Стратегия оптимизации процесса получения ТС была основана на смене окислительного режима культивирования при завершении деструкции боковой цепи ФС на восстановительный режим и на поддержании ресинтеза НАДН при постоянном давлении вносимой глюкозой. При сохранении этих условий концентрация мЦД в среде являлась основным фактором, определяющим эффективность процесса: скорость, степень превращения субстрата, выход целевого продукта, количественный и качественный состав побочных продуктов.

Конверсия фитостерина в тестостерон *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д в среде с мЦД.

Длительность окислительного режима конверсии ФС (10 г/л) в АД штаммом *M. neoaurum* ВКМ Ас-1815Д снижалась с 168 до 72 часов при увеличении в среде мольного соотношения ФС/мЦД от 1.0/0.15 до 1.0/1.4. При этом степень превращения субстрата варьировала в диапазоне 69.84-98.02 моль%. Наиболее высокий выход ТС, составивший 66.16 моль% (4,56 г/л), за 72 часа восстановительного режима был отмечен при соотношении ФС/мЦД 1.0/0.8 моль/моль. Содержание остаточного АД, непосредственного предшественника ТС, не превышало 5-10%. Проведенный расчет показал, что при мольном соотношении ФС/мЦД 1.0/0.8 соотношение ТС/АД составляло 6.89/1.0 моль/моль и более чем в 3 раза превышало соответствующие данные при соотношении ФС/мЦД 1.0/1.4. Наряду с ТС другим восстановленным при С17 стероидного ядра продуктом являлся андрост-1,4-диен-3-он-17-ол (дегидротестостерон, ДТ), содержание которого не превышало 6 моль%.

Конверсия фитостерина в тестостерон *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816Д в среде с мЦД.

Отличительной особенностью процесса конверсии ФС (10.0 г/л) культурой *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816Д при окислительном режиме (96 час) и дробном внесении глюкозы являлось накопление наряду с основным продуктом - АДД (61,7 моль%), другого продукта - АД (9.82 моль%), протекающего с участием стероид-1(2)-редуктазы. Суммарное содержание ТС и ДТ не превышало 2 моль%. Значительно более активное накопление АД по сравнению с ТС и ДТ указывает на очевидное стимулирование в большей степени 1(2)-редуктазной, а не 17 β -ГСД активности *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816Д. При восстановительном режиме (96 час) накопление ТС (выход 38 моль%) коррелировало со снижением АДД до 2,1 моль% при высоком содержании АД (21,5 моль%). Полученные данные указывают, что непосредственным предшественником ТС является АД.

Результаты исследований могут быть использованы при совершенствовании одностадийного микробиологического способа получения ТС из фитостерина.

Литература

1. Donova M.V, Egorova O.V. Appl Microbiol Biotechnol 2012. 5. 679-699
2. Lorena Fernandes-Cabezón, Beatriz Calan, Jose L. Garsia. Microb Biotechnol 2017. 10(1). 151-161.
3. Szentirmai A. J Ind Microbiol 1990. 6, 101-116.

Точечные мутации в H^+ -АТФазе плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: влияние на неорганические полифосфаты

Томашевский А.А., Петров В.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

H^+ -АТФаза плазматической мембраны – ключевой фермент метаболизма дрожжей, протонный насос, создающий электрохимический градиент ионов водорода ($\Delta\mu H^+$), который используется для активного транспорта веществ в клетку и поддержания внутриклеточного рН и ионного гомеостаза. Функционирование Pma1 H^+ -АТФазы и ее регуляция тесно связаны с метаболизмом глюкозы и других ферментируемых сахаров: параллельно гликолизу происходит созревание и функционирование фермента, сопровождающееся его фосфорилированием, конформационными изменениями и увеличением активности в 5-10 раз. Данное фосфорилирование является регуляторным; обнаружено около 10 фосфосайтов, являющимися остатками Ser и Thr. Показано, что активация H^+ -АТФазы дрожжей глюкозой связана с фосфорилированием остатков Ser-911 и Thr-912 в С-концевом цитозольном участке молекулы, но вовлеченность остальных фосфосайтов в этот процесс окончательно не установлена.

Неорганические полифосфаты (полиР) являются альтернативным источником энергии и фосфора, синтезируются в клетке с участием АТФ и тесно связаны с энергетическим обменом у дрожжей. Мы предположили, что метаболизм полиР может быть связан с фосфорилированием H^+ -АТФазы и ее функционированием. Целью работы было выяснить, влияют ли точечные мутации в Pma1 H^+ -АТФазе на содержание различных фракций неорганических полифосфатов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Для работы был выбран родительский штамм NY13 и мутанты с точечными заменами в нем аминокислотных остатков в трех топологически и функционально различных доменах фермента – мембранном (F796A, L801A, E803A), экстрацитозольном (S846A, E847A, T850A, T850S, D851A) и регуляторном С-концевом (S911A, S911D, T912D) доменах. В них аминокислотные остатки, которые теоретически могут (Ser, Thr, Asp, Glu) или не могут (Phe, Leu) фосфорилироваться, были заменены на Ala или же регуляторная фосфоэфирная связь, относящаяся к О-фосфорилированию (серин- и треонинфосфаты), была заменена на ковалентную (А-фосфорилирование: S911D, T912D). У использованных штаммов определяли параметры роста и активность АТФазы *in vitro*, экстрагировали ортофосфат, суммарные полиР и отдельные их фракции (PP1-5), отличающиеся как длиной цепи, так и локализацией и, соответственно, методом экстракции.

Мутации приводили к снижению активности H^+ -АТФазы в большинстве случаев в 2-4 раза (рис. 1), что могло влиять на характеристики роста штаммов, но прямо не коррелировало с ростовыми параметрами. Наибольшая корреляция между активностью фермента и ростом наблюдалась в случае удаления потенциальных фосфосайтов в экстрацитозольном домене (T850A, D851A). Влияние замен на содержание ортофосфата, которое изменялось не более, чем на 30-40%, также не коррелировало с АТФазной активностью. Более выраженным было влияние мутаций на содержание суммарной фракции полиР, которая в большинстве случаев увеличивалась (максимально для T850A

и D851A – в 1,7 и 1,5 раза, соответственно). Дробное фракционирование, однако, позволило обнаружить более значительные – и более тонкие – изменения в содержании отдельных фракций полиР (рис.1). Не было выявлено ни одного мутанта, который не отличался бы от дикого типа. Вместе с тем, наименее значительные изменения были обнаружены у мутантов с заменами в мембранном домене, а также у E847A в экстрацитозольном домене. Это логично, поскольку заменяемые остатки не могли фосфорилироваться в силу своего положения и/или химической природы.

Существенные изменения содержания полиР проявлялись у мутантов в регуляторном С-конце, несущим замены остатков Ser-911 и Thr-912, относящихся к установленным фосфосайтам: у S911D и T912D (и только у этих штаммов) в 2 раза падало содержание полиР1 и полиР4-5 (также у мутанта S911A). Содержание полиР2 и Р3 менялось в меньшей степени, причем чрезвычайно интересно, что изменение полиР2 у S911A и S911D было противоположным. Также противоположными были изменения полиР2 и Р3 у этой пары мутантов, что подтверждало их участие в фосфорилировании фермента, а также указывало на прямую или опосредованную связь функционирования АТРаза с метаболизмом полиР.

Среди мутантов экстрацитозольной части влияние замен на изменения содержания полиР было наиболее разнообразным. У мутанта S846A в 1,5 раза увеличивалось содержание полиР1 и Р3 и в 2 раза падало количество полиР4-5; у T850A увеличивалось содержание полиР1 (1,5 раза) и Р3 (3 раза); у D851A в 2 раза увеличивалось содержание полиР2 и Р3. Это может указывать как на возможность фосфорилирования остатков Ser-846, Thr-850 и Asp-851 в молекуле АТРаза, так и на возможную связь их фосфорилирования с метаболизмом полиР.

Учитывая, что в случае изученных мутантов, несущих точечные замены, из десяти известных (и, вероятно, еще нескольких не установленных) фосфосайтов блокируется или изменяется тип фосфорилирования лишь одного из них, следует признать обнаруженные отличия значительными. Т.о., данные настоящей работы позволяют утвердительно ответить на вопрос о взаимосвязанности функционирования АТРаза и метаболизма полиР, однако вопрос о тонких механизмах фосфорилирования фермента и доноре(ах) фосфора требует дальнейших исследований.

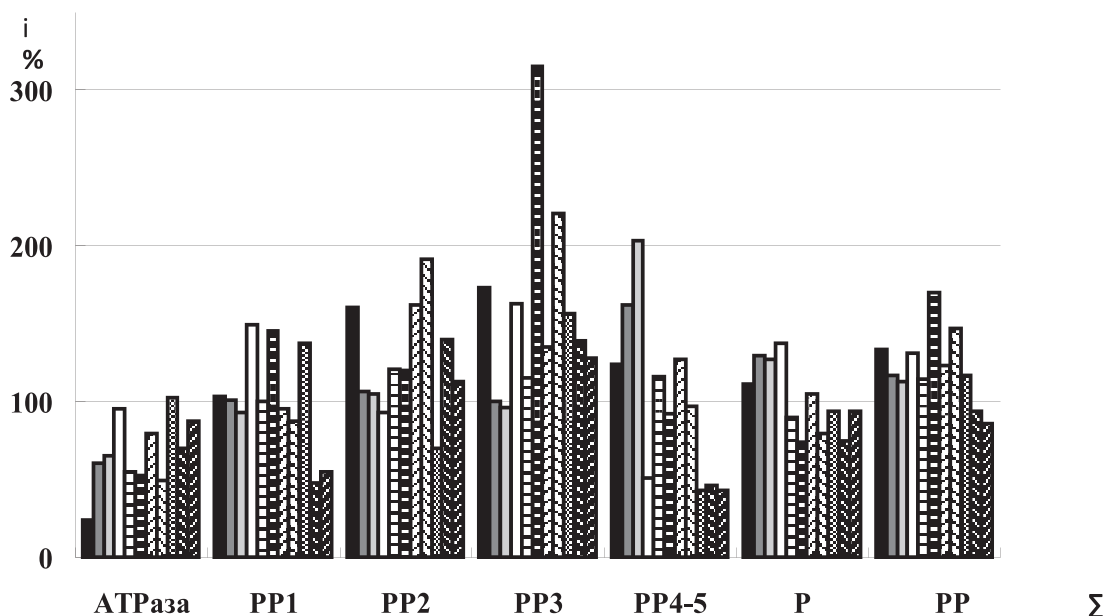


Рис. 1. Содержание ортофосфата, полиР различных фракций (PP1-PP4-5 и сумма □PP) и активность АТРаза в мутантных штаммах в % от родительского штамма. Штаммы слева направо: F796A, L801A, L803A, S846A, E847A, T850A, T850S, D851A, S911A, S911D, T912D

Роль гена METDI5511 в адаптации клеток *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 к использованию дихлорметана

Торгонская М.Л., Фирсова Ю.Е.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; maria.torgonskaya@gmail.com

Дихлорметан (CH_2Cl_2 , ДХМ) – преимущественно антропогенное высокотоксичное канцерогенное соединение, являющееся опасным загрязнителем окружающей среды вследствие летучести, хорошей растворимости в воде, персистентности и больших объемов промышленного производства. Ряд аэробных метиловых бактерий способны использовать ДХМ в качестве единственного источника углерода и энергии, осуществляя его первичное дегалогенирование с помощью хорошо изученного специфического фермента – дихлорметандегалогеназы. Формальдегид, который при этом образуется, является естественным метаболитом метилотрофов и может служить источником C_1 -единиц для биосинтеза клеточных компонентов. Вместе с тем показано, что успешность горизонтального переноса гена *dcmA* из модельного деструктора *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 в штаммы рода *Methylobacterium* (*M. extorquens* AM1, *M. nodulans* ORS 2060, *M. radiotolerans* JCM 2831, *M. populi* VJ001) зависит не столько от филогенетической близости штаммов, сколько от их функциональной гибкости. В частности, преимущество при выращивании трансформантов на ДХМ обеспечивали повышенная устойчивость к осмотическому и рН-стрессам.

Поскольку экспрессия белков, принимающих участие в ответе на стрессовые факторы, сопутствующие дегалогенированию ДХМ (колебания рН, накопление Cl^- , генотоксичность), должна активироваться или существенно увеличиваться при росте на этом токсиканте, выявить соответствующие генные детерминанты были призваны недавно проведенные протеомные и транскриптомные исследования клеток *M. dichloromethanicum* DM4. Одним из генов, с существенно возрастающей (в 20 раз) экспрессией при росте на ДХМ оказался METDI5511. Функциональное значение кодируемого им белка не установлено, однако он проявляет сходство с транскрипционными регуляторами Ros/MucR семейства – важными компонентами регуляторной системы биосинтеза экзополисахаридов у агробактерий и ризобий. Известно, что гидрофильные полисахариды, входящие в состав капсул и слизи, предохраняют клетки от повреждений, высыхания и могут создавать дополнительный осмотический барьер. Поскольку устойчивость к указанным факторам может быть важна при росте на ДХМ, целью данной работы было выяснение функциональной роли гена METDI5511 при росте *M. dichloromethanicum* DM4 на ДХМ и метаноле.

С использованием мобилизуемого суицидного вектора pK18mob нами сконструирован нокаут-мутант *Mb. dichloromethanicum* DM4 с инактивированным геном METDI5511, содержащим одновременно делецию кодирующей последовательности длиной 67 п.н. и инсерцию маркерного гена устойчивости к гентамицину. Комплементированный штамм $\Delta\text{METDI5511com}$ и штамм METDI5511over , содержащий дополнительные плазмидные копии гена METDI5511, получены путем переноса в штаммы $\Delta\text{METDI5511}$ и DM4wt (дикого типа) мультикопийного экспрессионного вектора pCM160 с геном METDI5511 и его последовательностью Шайна–Дальгарно под контролем промотора классической метанолдегидрогеназы ($P_{\text{мхaF}}$).

Мутантный штамм сохранял способность к росту на C_1 -соединениях, однако на ДХМ скорость роста была снижена как у клеток $\Delta\text{METDI5511}$, предварительно выращенных на метаноле, так и у преадаптированных к ДХМ. При сравнительной оценке устойчивости мутанта и исходного штамма DM4 к воздействию различных типов стрессов обнаружено, что мутант $\Delta\text{METDI5511}$ более чувствителен к повышенной концентрации хлорида натрия, этанолу и тепловому шоку, перекиси водорода и метилглиоксалу по сравнению с

исходным штаммом. Выживаемость клеток мутанта Δ METDI5511, выращенных до середины экспоненциальной фазы роста, после высушивания в течение 7 суток оказалась в 1.3 и 2.6 раза ниже показателей контрольного штамма при выращивании на ДХМ или метаноле, соответственно. Таким образом, повышенная чувствительность мутантного штамма к стрессам различной природы могла послужить причиной для снижения скорости его роста на ДХМ.

Различия в составе поверхностных полисахаридов у штаммов DM4wt, Δ METDI5511, Δ METDI5511com и METDI5511over были изучены с использованием окрашивания флуоресцентным стильбеновым красителем CFW (Calcofluor-White), присоединяющимся к целлюлозе и другим полисахаридам с α -1,3- и α -1,4-гликозидными связями. Интенсивность флуоресценции клеток мутанта Δ METDI5511, окрашенных CFW, существенно превышала соответствующие показатели для штамма DM4wt (167.5 и 117.3% к контролю при росте на ДХМ или метаноле, соответственно). В то же время комплементированный штамм Δ METDI5511com не отличался по интенсивности флуоресценции клеток от исходного штамма, а штамм METDI5511over демонстрировал самые низкие уровни флуоресценции клеток (81.0 и 91.5% к контролю на ДХМ или метаноле, соответственно). В культуральной жидкости исследуемых штаммов окрашиваемые CFW полисахариды накапливались в незначительных количествах, по сравнению с целыми клетками. Тем не менее, в среду мутантный штамм Δ METDI5511 также выделял существенно больше полисахаридов, нежели штамм дикого типа (420 и 230% по отношению к контролю DM4wt, выращенному на метаноле и ДХМ соответственно). Следовательно, инактивация гена METDI5511 *M. dichloromethanicum* DM4 приводила к достоверному увеличению, а его сверхэкспрессия – к уменьшению содержания поверхностных полисахаридов, связывающихся с красителем CFW, что указывает на участие данного гена в регуляции биосинтеза полисахаридов.

При росте на ДХМ интенсивность флуоресценции клеток исходного и мутантного штаммов была в среднем в 5.0 и 3.5 раз ниже по сравнению с клетками, выращенными на метаноле, что свидетельствует об уменьшении доли поверхностных полисахаридов с α -1,3- и α -1,4-гликозидными связями у клеток деструктора, адаптированных к стрессовым условиям. Следовательно, повышение количества окрашиваемых CFW полисахаридов у нокаут-мутанта Δ METDI5511 могло способствовать снижению его толерантности к высушиванию и другим внешним физико-химическим стрессорам.

При сравнительном анализе профилей внешнемембранных белков клеток штаммов DM4wt, Δ METDI5511, Δ METDI5511com и METDI5511over методом одномерного денатурирующего гель-электрофореза с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков не выявлено специфичных для синтеза экзополисахаридов детерминант с уровнями экспрессии, отличными от таковых у штамма дикого типа. Тем не менее, ряд белков внешней мембраны продемонстрировали различия в уровнях экспрессии у исходного и мутантных штаммов – сидерофоры (METDI2772, METDI1162, METDI2538), порин (METDI3973), а также консервативные гипотетические белки (METDI1445, METDI3997). Следовательно, для дальнейшего изучения регуляторной роли гена METDI5511 в синтезе экзополисахаридов требуется анализ фракций белков цитоплазмы и внутренней мембраны с использованием высокоразрешающих методов.

Таким образом, нами впервые исследована функциональность гена METDI5511 *M. dichloromethanicum* DM4, а также показано его участие в регуляции состава поверхностных полисахаридов деструктора ДХМ и в процессах адаптации к различным типам стрессовых воздействий. Изучение регулона гена METDI5511 будет предметом дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-04458-а.

Устойчивость штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с генетически измененными уровнями полифосфатаз к действию ионов кадмия

Трилисенко Л.В., Кулаковская Е.В., Кулаковская Т.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; alla@ibpm.pushchino.ru

Кадмий (Cd(II)) относится к группе наиболее токсичных тяжелых металлов в окружающей среде. Действие его на микробные клетки широко изучается. Чувствительность к данному катиону у разных видов дрожжей варьирует. Неорганические полифосфаты (полиР), представляя собой полимер с высоким отрицательным зарядом, фактически являются природным комплексоном для катионов тяжелых металлов.

Целью работы было оценить роль неорганических полифосфатов в устойчивости клеток дрожжей к Cd(II), сравнивая его действие на штаммы *Saccharomyces cerevisiae* с генетически измененными активностями полифосфатаз и содержанием полиР (табл.1).

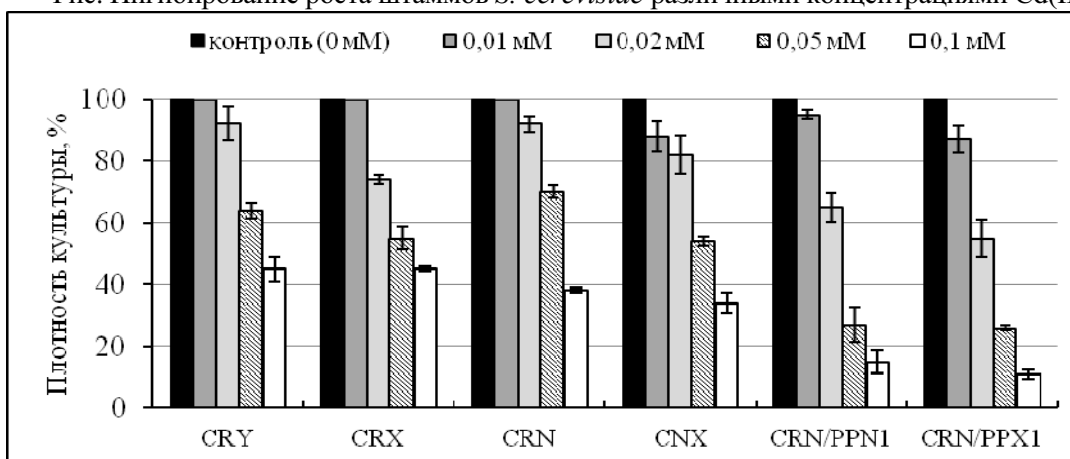
В работе рассмотрено влияние катионов Cd(II), а также никеля (Ni(II)) и кобальта (Co(II)) на рост штаммов и содержание в них полиР.

Табл.1. Штаммы, использованные в экспериментах.

Название штамма	Фенотип
CRY	родительский штамм
CRX	инактивирован ген экзополифосфатазы PPX1
CRN	инактивирован ген экзополифосфатазы PPN1
CNX	инактивированы гены экзополифосфатаз PPX1 и PPN1
CRN/PPN1	штамм CRN, трансформированный геном <i>PPN1 S.cerevisiae</i>
CRN/PPX1	штамм CRN, трансформированный геном <i>PPX1 S.cerevisiae</i>

Все штаммы были чувствительны к ионам кобальта, никеля и особенно кадмия. Концентрация ионов ингибирующая примерно на 50% рост штаммов для Cd(II) была на два порядка ниже, чем ионов для Ni(II) и Co(II). Штаммы, обладающие сверхэкспрессией экзополифосфатаз CRN/PPN1 и CRN/PPX1, были более чувствительными к присутствию в среде ионов Cd(II) по сравнению с родительским штаммом CRN. Концентрация Cd(II) наполовину ингибирующая рост для данных штаммов составляла 0,02 мМ и 0,05 мМ, соответственно (рис).

Рис. Ингибирование роста штаммов *S. cerevisiae* различными концентрациями Cd(II)



Такое различие в чувствительности к Cd(II) может быть вызвано различием в метаболизме полиР у трансформантов и родительского штамма.

Табл. 2. Содержание полиР (мкмольР/г сух. веса) в клетках штаммов *S. cerevisiae* в стационарной стадии роста при выращивании в контрольных условиях и в присутствии 0,04 мМ Cd(II).

Штамм	Контроль			0,04 мМ Cd(II)		
	КР полиР	КнР полиР	Сумма	КР полиР	КнР полиР	Сумма
CRN	260	172	432	277	266	543
CRN/PPX1	286	191	477	136	291	427
CRN/PPN1	134	153	287	78	219	297

Содержание полиР в клетках при выращивании в присутствии Cd(II) существенно изменялось по сравнению с контролем только у родительского штамма CRN, увеличиваясь на ~25% (табл.1). У всех трех штаммов повышалось содержание длинноцепочечных кислотонерастворимых полиР (КнР полиР). Содержание короткоцепочечных кислоторастворимых полиР (КР полиР), локализованных преимущественно в цитоплазме, у трансформантов в отличие от родительского штамма снижалось. Возможной причиной снижения фракции особенно в клетках, растущих в присутствии Cd(II), является наличие в цитоплазме трансформантов рекомбинантных PPN1 и PPX1 экзополифосфатаз. Ранее было показано, что полиР кислоторастворимой фракции играют важную роль в детоксификации тяжелых металлов у дрожжей [1]. Поэтому снижение полиР данной фракции у трансформантов привело к повышению у них чувствительности к Cd(II).

Литература

Andreeva N, Ryazanova L, Dmitriev V, Kulakovskaya T. Cytoplasmic inorganic polyphosphate participates in the heavy metal tolerance of *Cryptococcus humicola*. Folia Microbiol 2014; 59: 381-389.

Сравнительная геномика бактерий *Sphaerochaeta*

Трошина О.Ю.¹, Ошуркова В.И.¹, Бочкарева О.О.², Драненко Н.О.³, Щербакова В.А.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, г. Пущино; oltro676@yandex.ru

²ФГБУН Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, г. Москва; olga.bochkaryova@gmail.com

³ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт»
Dranenko@phystech.edu

Бактерии рода *Sphaerochaeta* семейства *Spirochaetaceae* характеризуются необычной для спирохет кокковидной морфологией и отсутствием аксиальных фибрилл, обуславливающих характерный для спирохет способ движения. Последовательности генов 16S рРНК близкие к *Sphaerochaeta* встречаются повсеместно в пресноводных осадках, нефтеносных слоях, анаэробных реакторах, а также в нормальной автохтонной микрофлоре животных. В настоящее время таксономически описаны четыре вида *Sphaerochaeta*: *S. globosa* и *S. pleomorpha*, выделенные из накопительных культур бактерий, восстанавливающих органические хлорсодержащие соединения, *S. coccoides*, изолированная из кишечника термита и *S. associata*, выделенная нами из бинарной метаногенной культуры. Цель данного исследования заключалась в сравнительном анализе геномов *Sphaerochaeta* spp. для выяснения генетических и метаболических

характеристик, лежащих в основе тесного взаимодействия *Sphaerochaeta* spp. с другими микроорганизмами в анаэробных сообществах.

Анализ геномов *Sphaerochaeta* показал отсутствие у них ряда генов, кодирующих пенициллин связывающие белки, участвующие в последних этапах синтеза пептидогликана. Во всех геномах также отсутствуют гены, ответственные за подвижность и хемотаксис. Эти данные согласуются с фенотипической характеристикой этой группы бактерий как неподвижных кокков, устойчивых к пенициллинам. Сравнение функциональных профилей геномов *Sphaerochaeta* и некоторых других микроорганизмов указывает на значительную долю в геномах сферохет группы генов метаболизма и транспорта углеводов. Деградация углеводов осуществляется по пути гликолиза и окислительного пентозофосфатного цикла, а также брожения по смешанному типу. Продукты метаболизма *Sphaerochaeta*, такие как ацетат, формиат, H₂, CO₂ и метанол являются субстратами для роста метаносарцины. В геномах *Sphaerochaeta* отсутствуют гены ключевых белков дыхательных электрон-транспортных цепей. Все *Sphaerochaeta* являются аэротолерантными анаэробами и содержат гены белков детоксикации кислородных радикалов, таких как каталазы, Mn-супероксиддисмутазы, супероксидредуктазы, глутаредоксина, глутатион пероксидазы, пероксиредоксина. В геноме *S. coccoides* нет ни одного гена синтеза кобаламина, а в геномах *S. associata*, *S. globosa* и *S. pleomorpha* только четыре гена в пути биосинтеза кобаламина.

Геномы *Sphaerochaeta* кодируют широкий спектр транспортных белков и ферментов метаболизма углеводов и уроновых кислот, что согласуется с характеристикой сферохет как анаэробных хемогетеротрофов-сахаролитиков. В таблице 1 представлены семейства ферментов, проявляющих активность в отношении углеводов (CAZy семейства), которые были обнаружены в геномах *Sphaerochaeta*. Наиболее представлены в геномах семейства гликозил-гидролаз (GH), такие как β-галактозидазы (GH2), β-глюкозидазы (GH3), α-галактозидазы (GH4), глюкозидазы семейства GH13, α-ксилозидазы и α-глюкозидазы (GH31). В геномах сферохет есть гены ферментов деградации пектина (пектин эстераза (CE8), полигалактуроназа (GH28), рамногалактуронил гидролаза (GH105)), крахмала (GH13), хондроитина (хондроитин дисахарид гидролаза (GH88) и хондроитин АС/альгинат лиаза (PL12)) (Табл. 1). Геном *S. pleomorpha* кодирует также декстраназу (GH66).

Табл. 1. CAZy семейства, представленные в геномах *S. associata* (1), *S. globosa* (2), *S. pleomorpha* (3), *S. coccoides* (4).

CAZy семейство	1	2	3	4	CAZy семейство	1	2	3	4	CAZy семейство	1	2	3	4
GH1	1	1	1	2	GH38	1	0	0	1	GH88	2	1	0	1
GH2	5	5	4	4	GH43	3	2	1	1	GH94	1	1	0	0
GH3	4	4	4	1	GH50	0	0	1	0	GH97	0	0	0	1
GH4	4	3	1	1	GH51	1	1	0	1	GH105	4	3	1	3
GH9	0	0	1	0	GH52	0	0	0	1	GH112	2	1	0	0
GH13	4	4	6	4	GH57	3	3	3	3	GH127	1	2	0	0
GH15	0	0	1	0	GH59	0	0	0	1	CE8	1	1	1	1
GH20	2	2	2	1	GH63	1	1	1	1	CE9	3	3	3	1
GH28	1	2	1	1	GH65	0	0	2	1	CE12	1	1	0	1
GH29	1	1	0	1	GH66	0	0	1	0	CE14	0	0	1	0
GH30	0	0	2	0	GH67	0	0	0	1	CE15	0	0	1	0
GH31	5	5	6	0	GH77	2	2	2	2	PL12	3	1	1	2
GH36	1	1	1	2	GH78	0	1	0	0	PL26	0	0	0	1

Наличие генов деградации хондроитина, являющегося аналогом метанохондроитина метаносарцин, а также возможность получать предшественники для синтеза кобаламина

от метаносарцины создают, по-видимому, основу для тесного сосуществования *S. associata* с метаносарциной. Для изучения взаимодействия *S. associata* с *M. mazei* JL01 предполагается оценить долю генов, полученных в результате горизонтального переноса, в геномах *S. associata* и *M. mazei* JL01.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-08612. Секвенирование и аннотация генома *S. associata* выполнены в U.S. Department of Energy Joint Genome Institute, DOE Office of Science и поддержано грантом No. DE-AC02-05CH11231.

Литература

1. Troshina O., Oshurkova V., Suzina N., Machulin A., Ariskina E., Vinokurova N., Kopitsyn D. & Shcherbakova V. (2015). *Sphaerochaeta associata* sp. nov., a spherical spirochaete isolated from cultures of *Methanosarcina mazei* JL01. Int J Syst Evol Microbiol 65 (12): 4315-22. doi: 10.1099/ijsem.0.000575. Epub 2015 Sep 3.
2. Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichius K., Petrovskaya L., Krivushin K., Kraev G., Pecheritsina S. & Gilichinsky D. (2007). Biogeochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. FEMS Microbiol Ecol 61:1-15. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00315.x

Двухдоменная лакказа бактерии *Streptomyces anulatus* VKM Ac-728 – получение, свойства, взаимодействия с гуминовыми веществами.

Трубицина Л.И.¹, Лисова З.А.¹, Трубицин И.В.¹, Лисов А.В.^{1,2}, Заварзина, А.Г.³, Леонтьевский А.А.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, lyubov_yurevich@mail.ru

²ФГБУ ВО «Пушинский государственный естественно-научный институт»

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Почва – сложная органо-минеральная структура, представляющая верхний слой поверхности Земли и обладающая плодородием. Гуминовые вещества (ГВ) составляют главную часть органического вещества почвы. Данные соединения являются органическими молекулами различной степени полимерности. Синтез ГВ – сложный процесс, происходящий под воздействием микроорганизмов и абиотических факторов. Основой для синтеза ГВ являются растительные остатки. Микроорганизмы трансформируют растительные остатки с помощью различных ферментов. Одной из основных оксидаз, продуцируемой почвенными грибами и бактериями, является лакказа – фермент, катализирующий окисление фенольных соединений кислородом. Лакказы разделяют на двухдоменные (2д) и трёхдоменные (3д) ферменты, молекулы которых соответственно организованы двумя или тремя доменами. 3д лакказы являются изученными ферментами, их участие в процессах трансформации ГВ хорошо известно. 2д лакказы изучены меньше, обнаружены они только у бактерий. Участие 2д лакказ в трансформации ГВ не изучено, что странно, так как основными продуцентами этого фермента являются бактерии рода *Streptomyces*, широко распространенные в почве. Цель данной работы – характеристика 2д лакказы бактерии *S. anulatus* VKM Ac-728 и исследование трансформации ГВ этим ферментом. В геноме *S. anulatus* был идентифицирован ген 2д лакказы. Ген лакказы был клонирован без последовательности сигнального пептида в вектор pQE-30. Для экспрессии фермента в культуру *E.coli* M15 (pRep4), трансформированную плазмидами со вставкой, вносили индуктор 0,1 мМ ИПТГ, а также 0,25 мМ CuSO₄. Очистку лакказы проводили в две стадии: аффинная хроматография и гель-фильтрация. Лакказа была получена в электрофоретически гомогенном состоянии. Молекулярная масса фермента, согласно данным ДСН-ПААГ-электрофореза, составила 39 кДа, что хорошо согласуется с теоретически рассчитанной на

основании последовательности гена величиной (35,6 кДа). Фермент катализировал окисление субстрата АБТС с оптимумом при pH 3,0 и 2,6-диметоксифенол с оптимумом при pH 9,0. Был более стабилен при значениях pH 5-11 (после 3 ч инкубирования сохранял более 80% начальной активности). Температурный оптимум лакказы составил 75°C. Остаточная активность фермента после часа инкубирования при 70°C, 80°C и 90°C составила 50%, 40% и 15%, соответственно. Фермент эффективно катализировал окисление АБТС ($K_M=0,017\text{ММ}$, $k_{\text{кат}}=4,72\text{сек}^{-1}$) и $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($K_M=6,7\text{ММ}$, $k_{\text{кат}}=21,8\text{сек}^{-1}$). Окисление фенолов происходило менее эффективно – 2,6-диметоксифенола ($K_M=1,64\text{ММ}$, $k_{\text{кат}}=0,32\text{сек}^{-1}$) и гваякола ($K_M=7,8\text{ММ}$, $k_{\text{кат}}=0,075\text{сек}^{-1}$). 2д лакказа эффективно трансформировала полимеризовала ГВ, увеличивая степень её полимеризации. Так же 2д фермент увеличивал степень полимеризации низкомолекулярной и высокомолекулярной фракции ГВ. Таки образом, нами впервые показана возможность трансформации ГВ 2д лакказами.

Микробиологический анализ многолетнемерзлых отложений острова Западный Шпицберген

Трубицын В.Э.^{1,2}, Рыжманова Я.В.², Спирина Е.В.³, Лауринавичюс К.С.²,
Ривкина Е.М.³, Щербакова В.А.²

¹ФГБОУ ВО «Пуцинский естественно-научный институт»

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

³ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
г. Пущино, lichoradkin43@gmail.com

Низкотемпературные экосистемы оказывают большое влияние на формирование климата Земли и являются индикатором его состояния. Не смотря на большие достижения последних лет в изучении микробиоты ледников и активного слоя мерзлоты Арктики, микробные сообщества многолетнемерзлых отложений (ММО) архипелага Шпицберген остаются неизученными. Цель данного исследования состояла в первичном микробиологическом анализе образцов ММО о. Западный Шпицберген (Норвегия), отобранных на глубине от 0,5 до 3,7 м.

Изучение микробного разнообразия проводили методом предельных разведений на жидких и твердых средах в условиях культивирования для аэробов и анаэробов при температурах 6-7 и 20°C. Идентификация изолированных колоний осуществлялась с помощью метода MALDI TOF масс-спектрометрии.

Полученные результаты показали, что во всех образцах ММО были обнаружены микроорганизмы, численность которых составляла от $0,45 \times 10^2$ до $6,0 \times 10^6$ клеток/г породы.

Среди анаэробов метанобразующие археи, сульфатовосстанавливающие бактерии и ацетогены обнаружены не были, однако, в образцах s5 (2,9 метров) и s2 (3,7 метров) был зафиксирован процесс железоредукции. Гетеротрофные анаэробные микроорганизмы присутствовали во всех образцах. В аэробных условиях как на богатой (TSA), так и на олиготрофной среде (R2A) численность достигала $3,1 \times 10^2$ КОЕ/г. Анализ колоний методом MALDI TOF масс-спектрометрии позволил определить представителей филумов *Actinobacteria* (рода *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*), *Firmicutes* (род *Paenibacillus*), *Proteobacteria* классов *Alphaproteobacteria* (род *Sphingomonas*), *Betaproteobacteria* (род *Massilia*) и *Gammaaproteobacteria* (рода *Heatophilus* и *Pseudomonas*).

Дальнейшее исследование прокариотных сообществ образцов ММО о. Западный Шпицберген молекулярно-экологическими методами позволит понять его структуру и оценить вовлеченность бактерий и архей в биогеохимические процессы. Изучение свойств

выделенных культур поможет понять способы их адаптации к низким температурам и оценить их биотехнологический потенциал.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-08612.

Влияние концентрации железа на регуляцию экспрессии генов деградации салицилат-иона штамма *Pseudomonas putida* AK5

Филатова И.Ю., Захарова М.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино, irafilatova24@gmail.com

Метаболические пути деструкции ароматических соединений организованы конвергентно, в результате чего любое ароматическое соединение трансформируется в один из 10 центральных метаболитов, которые далее деградируются до интермедиатов ЦТК или используются для синтеза необходимых клетке соединений [Ladino-Orjuela et al, 2016]. Лишь некоторые из этих центральных метаболитов (в т.ч. и салицилат-ион) способны выступать в качестве кофактора транскрипционных регуляторов [Fuchs et al, 2011]. Это позволяет клетке тонко регулировать множество важных клеточных процессов посредством узкого круга соединений. К настоящему моменту известно, что салицилат-ион участвует в инициации транскрипции генов деградации высокомолекулярных предшественников салицилат-ионов, самой салициловой кислоты и ее замещенных [Fujihara et al, 2006], влияет на формирование фенотипа множественной антибиотикоустойчивости [Sulavik et al, 1995], на основе салицилат-иона бактерии способны синтезировать сидерофоры [Kannahi et al, 2014, Jensen et al, 2015]. Однако мало исследовано, каким образом идет перераспределение салицилат-иона между указанными метаболическими путями. Салицилат-ион, в данном случае, выступает как в роли кофактора регуляторов транскрипции данных процессов, так и в роли атакуемого субстрата.

В условиях недостатка железа микроорганизмы продуцируют во внешнюю среду сидерофоры. В ряде работ показано, что гены синтеза салицилата и синтеза сидерофоров расположены в составе одного оперона и зависят от концентрации железа в окружающей среде.

Ранее методом ОТ-qPCR было показано, что при росте штамма *P. putida* AK5 на богатой питательной среде эффективность транскрипции *sgp*-оперона в условиях индукции салицилат-ионом увеличивается на три порядка. На данный момент это является самым высоким показателем для регуляторов семейства, к которому относятся NahR-подобные белки [Filatova et al., 2017]. При росте штамма на бедной минеральной среде M9, без добавления источника железа, уровень экспрессии *sgp*-оперона в присутствии салицилата натрия увеличивается всего на один порядок.

Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий приаральского региона с использованием новых биопрепаратов

Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Фунтикова Т.В., Делеган Я.А.

ФГБУН биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

Более половины мировых запасов нефти находится на территориях с жарким климатом, где специфика природных климатических условий вынуждает более тщательно подходить к выбору адекватного метода ремедиации загрязненных земель. Отличительной особенностью нефтяных загрязнений в Приаральском регионе Казахстана является то, что данные территории находятся, главным образом, в климатической зоне резко

континентального климата с преобладанием высоких температур в летний период, а почва представляет собой солончаки с содержанием соли 3-4%, очень низкими показателями влажности и содержания органических веществ. Последние исследования показали, что биоремедиация, основанная на принципе активизации почвенной микрофлоры, недостаточно эффективна в условиях высоких температур. Применение ассоциации штаммов бактерий для очистки почв и вод представляет собой экологически безопасный и перспективный подход для ликвидации последствий разливов нефти и нефтепродуктов в условиях жаркого аридного и резко континентального климата при повышенной солёности почвы и воды.

Целью данной работы было разработка новых перспективных биопрепаратов и технологии для эффективной очистки экосистем от нефтяных загрязнений в условиях жаркого аридного климата.

Характеристика объектов и методов исследований

Объектом исследования стали почвы Южно Тургайского прогиба, загрязненные нефтью. Образцы отбирали с территорий месторождения «Кумколь» (АО «Тургай Петролеум»), «Кумколь» (АО «Петро Казахстан»), «Таур» (ТОО «КазПетролГрупп») и «Ащисай» (АО КОР).

Количественное определение почв на загрязнение нефтью проводили ИК-спектрометрическим и гравиметрическим методами. Изучение углеводородного состава нефти в почвенных образцах определяли с помощью газового хромато-масс спектрометра. Определение массовой доли нефти в исследуемых почвенных образцах проводили согласно методике РД 52.18.647-2003, предназначенной для использования в лабораториях, выполняющих измерения в области мониторинга загрязнения окружающей среды и количественного химического анализа уровней загрязнения почв нефтью.

Образцы почвы с нефтедобывающих месторождений Южно Тургайского прогиба по содержанию остаточной нефти (12-103 г/кг почвы) соответствуют уровню экологического загрязнения, когда требуется проведение биоремедиационных мероприятий для восстановления почвенных экосистем. Наибольшее загрязнение наблюдалось в почве Кумколь (АО «Тургай Петролеум») и Таур (ТОО «КазПетролГрупп»): соответственно, 67 и 26 г/кг. Результаты хроматографического анализа показали, что в нефтях преобладают неразветвленные алканы (до 73%), разветвленные алканы до 12%, нафтены до 7% и до 6% аренов. Нефть месторождения Кумколь (АО «Петро Казахстан») несколько отличается от других исследуемых нефтей. Она содержит 61% алканов (из них 12% разветвленные, 48% неразветвленные), незначительное количество нафтенных и аренов (1%), но высокий процент кислород-, сера-, галогенсодержащих производных углеводородов (38%).

Был проведен микробиологический анализ изучаемых почв. Исследование общей численности микроорганизмов и численности нефтеокисляющих микроорганизмов показало их низкие значения: 10^5 и 10^4 КОЕ/ г почвы, соответственно. Выделены и охарактеризованы чистые культуры аборигенных микроорганизмов-нефтедеструкторов, создана коллекция штаммов, способных утилизировать ароматические и алифатические углеводороды, перспективных для дальнейших исследований.

Был проведен эксперимент по изучению степени деструкции нефти исследуемыми штаммами в жидкой минеральной среде с 2% нефти при различных температурах в течение 10 дней. На основании определения степени деструкции нефти индивидуальными штаммами было составлено 4 ассоциации микроорганизмов – эффективных деструкторов углеводородов нефти. Методами гравиметрии и ИК-спектрофотометрии была определена степень биodeградации нефти этими ассоциациями, которая составила от 30 до 70%.

Фракционный анализ остаточных углеводородов после биodeградации нефти позволил выбрать наиболее эффективную ассоциацию. С использованием капиллярной газожидкостной хроматографии была проведена количественная оценка остаточного содержания 13 различных ПАУ (с количеством колец от 3 до 6), а также изучены особенности утилизации n-алканов в образцах, полученных после деградации высоких

концентраций нефти (15%) исследуемыми микробными ассоциациями. Показано, что наиболее эффективная ассоциация (*Rhodococcus erythropolis* KZ1, *Rhodococcus erythropolis* KZ2 и *Pseudomonas putida* KZ3) деградировала 48% исследуемых н-алканов и 38,9% ПАУ (число колец 3 – 6) по сравнению с контролем (среда с нефтью без микроорганизмов).

Наиболее эффективная ассоциация (штаммы-нефтедеструкторы *Rhodococcus erythropolis* и *Pseudomonas putida*) обладает антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным грибам родов *Fusarium*, *Rhizoctonia* и *Gaeumannomyces*, нанесение этих штаммов на газон микромицетов вызывало появление зон ингибирования.

Были проведены испытания двух новых биопрепаратов в июне-июле 2017 на территории месторождения Кукурыз (Кызылординская обл., РК). Для проведения полевых работ были получены лиофилизированные биопрепараты с численностью микроорганизмов $8,0 \times 10^{10}$ КОЕ/г. В качестве контроля в полевых испытаниях служил нефтезагрязненный участок без обработки биопрепаратом. Активацию сухого биопрепарата проводили на месте испытаний, растворяя в воде с добавлением дизельного топлива и аэрируя в течение 14-18 ч. При внесении биопрепарата в почву добавляли минеральные и органические удобрения. Для определения общей численности микроорганизмов и содержания нефти отбирали усредненные пробы из 3-4 разных участков почвы каждые 2 недели. Через 2-3 недели биопрепараты вносили повторно. Результаты испытаний показали удаление 70-80 % нефтяного загрязнения за 1,5 месяца. Температура воздуха в этот период составляла от 12 до 45° С.

Штаммы KZ1, KZ2 и KZ3, используемые в составе биопрепарата, были депонированы в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, г. Астана.

Подана заявка на патент РК «Ассоциация штаммов бактерий для удаления нефти и нефтепродуктов из грунтов и вод в условиях резко континентального и жаркого аридного климата» Нарманова Р.А., Филонов А.Е., Аппазов Н.О., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Фунтикова Т.В. Изобретение представляет собой ассоциацию штаммов бактерий, которая эффективно утилизирует нефть и нефтепродукты в широком диапазоне температур (от 4°С до 50°С) и обладает микостатической активностью (подавляет фитопатогенные грибы). В состав ассоциации входят три штамма бактерий – *Rhodococcus erythropolis* KZ1, *Rhodococcus erythropolis* KZ2, *Pseudomonas putida* KZ3. Ассоциация может быть использована в засоленных (до 8% соли) грунтах и водах, в диапазоне pH 4-9, а также при низкой влажности грунта (порядка 10%). Препарат эффективен при уровне загрязнения грунта до 15% (150 г нефти на 1 кг грунта), при более высоком загрязнении нужно уменьшить концентрацию нефтепродуктов доступными способами. Для максимального результата по удалению загрязнителя численность клеток ассоциации на очищаемой территории должна быть не менее 1×10^4 - 1×10^6 КОЕ/г грунта в зависимости от уровня загрязнения.

На основании полученных результатов была разработана стратегия очистки загрязненных территорий с использованием агротехнических и биоремедиационных мероприятий для конкретных нефтезагрязненных территорий Республики Казахстан.

Работа выполнена при поддержке Казахстанско-российского проекта № 142 «Разработка концепции мониторинга загрязненных нефтью почв Приаральского региона и технологий их очистки с использованием новых биопрепаратов».

Участие транскрипционного фактора NahR в регуляции *sgp*-оперона штамма *Pseudomonas putida* AK5

Фролова А.А.^{1,2}, Фунтикова Т.В.², Филатова И.Ю.²

¹ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино, irafilatova24@gmail.com

Конверсия нафталина в интермедиаты ЦТК может происходить либо через образование салицилат-иона и катехола, либо салицилат- и гентизат-ионов. Наиболее всего исследована генетическая организация и регуляция экспрессии генов деградации нафталина в штамме *Pseudomonas putida* G7 (pNAH7). Продукты генов *nah1*-оперона связаны с трансформацией нафталина в салицилат-ион (так называемый «верхний путь»), *nah2*-оперона – с деградацией салицилата до интермедиатов ЦТК через образование катехола, с дальнейшим его расщеплением по мета-пути («нижний путь»). Опероны катаболизма нафталина и салицилата находятся под позитивным контролем единственного транскрипционного регулятора LysR-семейства (LTTR) - белка NahR.

Штамм *Pseudomonas putida* AK5, первый описанный природный штамм, в котором присутствует как «классические» *nah1*-оперон и ген *nahR*, так и гены, продукты которых отвечают за менее охарактеризованный путь деградации салицилата через гентизат (*sgp*-оперон, salicylate –gentisate pathway) [Izmalkova et al, 2013].

Нуклеотидная последовательность амплифицированного фрагмента ДНК (размером 540 п.н.) *nahR* гена из штамма *P.putida* AK5 была на 100% идентична аналогичному региону детально исследованных плазмид деградации нафталина pDTG-1 и pND6-1 [Dennis and Zylstra, 2004, Wei Li et al, 2004].

Транскрипционный регулятор *SgpR* идентичен (по аминокислотной последовательности) описанным LTTRs оперонов деградации салицилата (и нафталина, его высокомолекулярного предшественника) NahR (pDTG1, pND6-1, pNAH7) на 50% (салицилат-катехол-ЦТК), NagR штаммов *Ralstonia* sp. U2 на 53% и *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 на 57% (салицилат-гентизат-ЦТК). В то время как между собой указанные регуляторы NahR показывают идентичность от 91 до 100%, регуляторы NagR 85%. Недавно было определено, что белок SgpR связывается в регуляторной области *sgp*-оперона, а в присутствии салицилат-иона экспрессия *sgp*-оперона увеличивается [Filatova et al., 2017].

Транскрипционные регуляторы NahR и SgpR состоят из ДНК-связывающего домена и субстрат-связывающего домена. Салицилат-ион является кофактором двух указанных регуляторов, ДНК-связывающий домен представителей LysR-семейства в принципе достаточно консервативен. По этой причине было решено проверить участие транскрипционного фактора NahR в регуляции транскрипции *sgp*-оперона.

Штамм *E.coli* M15[pREP4, p184.sgp, pQE30.nahR] культивировали в чашках Петри на агаризованной среде MacConkey без модификаций и с добавлением салицилата натрия в концентрации 0,01 г/л. В качестве положительного контроля использовали штамм *E.coli* M15[pREP4, p184.sgp, pQE30.sgpR], в качестве отрицательного контроля штамм *E.coli* M15[pREP4, p184.sgp, pQE30]. Штамм *E.coli* M15[pREP4, p184.sgp, pQE30.nahR] в присутствии/отсутствии салицилата натрия окрашен белым (сравнимо с отрицательным контролем), а значит, активации *sgp*-оперона посредством NahR в присутствии салицилат-иона не происходит.

Генетический контроль деградации замещенных салицилатов у штамма *Pseudomonas putida* AK5

Фролова А.А.^{1,2}, Филатова И.Ю.², Захарова М.В.²

¹ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»; ali.frolowa@yandex.ru

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино

В аэробных условиях разрушение ароматических углеводов происходит путем расщепления ароматического кольца диоксигеназами. Однако эти ферменты действуют лишь в том случае, если у ароматического кольца имеются две гидроксильные группы в орто- или пара-положении по отношению друг к другу. Поэтому введение одной или двух гидроксильных групп в ароматическое кольцо является одним из первых этапов биodeградации ароматических соединений [Narayana S., Timmis K. N., 1989]. В связи с тем, что в природе чаще встречаются замещенные производные ароматических соединений, ферменты их катаболизма часто обладают широкой субстратной специфичностью [Díaz E., Jiménez I., Nogales J., 2013]. Однако, в большинстве случаев биodeградация ароматических соединений сводится к образованию узкого круга ключевых соединений, одними из которых являются салицилат и катехол [Ladino-Orjuela G. et al, 2016]. Поэтому некоторые микроорганизмы – деструкторы обладают ферментными системами, обеспечивающими элиминирование заместителей и образование дигидроксилированных ароматических соединений. Отщепление заместителя может происходить на разных стадиях катаболизма. В зависимости от этого бактерии могут быть разделены на две группы: осуществляющие трансформацию заместителя до разрушения ароматического кольца и после [Zaitsev G. M. et al, 1991].

В данной работе исследовали влияние различных производных салициловой кислоты на активацию транскрипции регуляторного гена *sgp*-оперона деградации салицилата штамма *P. putida* AK5, осуществляющего трансформацию салицилата через гентизат. Способность различных замещенных салицилатов влиять на экспрессию генов *sgp*-оперона оценивали по изменению уровня транскрипции. В штамме *P. putida* AK5 уровень транскрипции гена *sgpA* определяли методом ОТ-ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени, в трансформированном плазмидными конструкциями штамме *E. coli* Z85 измеряли активность репортерного гена *lacZ*.

Полученные данные были разделены на несколько групп. Субстраты, при индукции которыми активность продукта гена *lacZ* была выше 10000 ед. акт. Миллера отнесены к группе очень высокой степени активации; от 1000 до 10000 ед. акт. Миллера – высокой; от 500 до 1000 ед. акт. Миллера – средней; до 500 ед. акт. Миллера – низкой. Субстраты, при индукции которыми уровень транскрипции был свыше $1 \cdot 10^4$ отнесены к группе очень высокой степени активации; свыше $1 \cdot 10^5$ – высокой; свыше $1 \cdot 10^6$ – средней; ниже $1 \cdot 10^6$ – низкой (ингибирование транскрипции) (табл. 1).

Результаты показывают, что существуют некоторые различия в активации транскрипции генов, контролируемых регуляторным *sgpR*, для *P. putida* и *E. coli*. При росте на 4-метил и 5-метилсалицилате в штамме *P. putida* AK5 наблюдается высокий уровень активации транскрипции генов *sgp*-оперона, в штамме *E. coli* Z 85 при добавлении этих соединений в питательную среду активность продукта репортерного гена *lacZ* на уровне контроля в отсутствие индуктора. Такое различие может объясняться тем, что бактерии рода *Pseudomonas* являются типичными представителями деструкторов ароматических соединений, поэтому могут иметь механизмы трансформации исходных субстратов до соединений, способных выступать в качестве кофактора регуляторных белков оперонов деградации ароматических соединений.

Табл. 1. Изменение уровня транскрипции

Степень активации	Объект исследования	
	<i>E. coli</i> (ед. акт. Миллера)	<i>P. putida</i> (отн. уровень мРНК)
Очень высокая	Салицилат натрия (10395,1)	Салицилат натрия ($2,6 \cdot 10^{-6}$)
Высокая	3-хлорсалицилат (1180,8) 5-хлорсалицилат (1826,4)	3-хлорсалицилат ($7,0 \cdot 10^{-5}$) 5-хлорсалицилат ($2,8 \cdot 10^{-5}$) 4-метилсалицилат ($9,9 \cdot 10^{-5}$) 5-метилсалицилат ($1,3 \cdot 10^{-5}$)
Средняя	Гентизат (596,0)	Гентизат ($7,6 \cdot 10^{-6}$)
Низкая	4-метилсалицилат (286,4) 5-метилсалицилат (180,6) 5-аминосалицилат (195,3)	5-аминосалицилат ($2,0 \cdot 10^{-7}$)
Отсутствие индуктора	(113,4)	($2,3 \cdot 10^{-6}$)

Для микроорганизмов, деградирующих салицилат через орто-расщепление катехола, например, *Pseudomonas* sp. МТ1 показано, что поступающие в клетку в качестве субстратов 4-метил и 5-метилсалицилаты, предварительно трансформируются в 4-метилкатехол и далее в таком виде подвергаются расщеплению ароматического кольца [Cámara B. et al, 2007]. Можно предположить, что в штамме *P.putida* АК5 4-метил и 5-метилсалицилат трансформируются, и уже полученный продукт является кофактором регуляторного белка SgpR.

При индукции регуляторного гена *sgpR* в штамме АК5 5-аминосалицилатом наблюдается ингибирование транскрипции генов *sgp*-оперона. В связи с тем, что аминогруппа способна активировать ароматическое кольцо также, как и гидроксигруппа, возможно прямое расщепление ароматического кольца без дополнительного участия гидроксилаз. Известен путь деградации 5-аминосалицилата у *Pseudomonas* sp. BN9 осуществляемый аналогично деградации гентизата ферментом гентизат-1,2-диоксигеназой, где происходит замена аминогруппы на гидроксигруппу после разрыва ароматического кольца с образованием фумарилпирувата [Stolz A., Nortemann B., Knackmuss H.-J., 1992].

У *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2 гены конверсии нафталина через гентизат разделены на два оперона: первый осуществляет трансформацию нафталина до расщепления ароматического кольца гентизата включительно, второй содержит гены катаболизма гентизата до интемедиатов ЦТК [Park M. et al, 2007]. Такая организация позволяет трансформировать некоторые субстраты без участия многокомпонентной салицилат-5-гидроксилазы. В штамме *P.putida* АК5 гены катаболизма нафталина через гентизат организованы в один оперон, деградация замещенных салицилатов происходит по определенному механизму, возможно с предварительной трансформацией заместителя. В случае 5-аминосалицилата, предположительно, предварительная трансформация не происходит, и либо штамм не способен вообще трансформировать 5-аминосалицилат, либо у него существуют альтернативные пути катаболизма этого соединения.

Новые изоляты метилотрофов рода *Methylopila* и распространение вида *Methylopila oligotropha*

Чемодурова А.А., Капаруллина Е.Н.

ФГБОУ ВО «Пушкинский государственный естественно-научный институт»
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино; Chemodurova.Alina@mail.ru

Аэробные метилотрофные бактерии (метилотрофы) используют в качестве источников углерода и энергии различные C_1 -соединения (метанол, метиламин, формальдегид, формиат и др.) и выполняют функцию природного биофильтра на пути эмиссии этих соединений в атмосферу. Одноуглеродные соединения присутствуют в сточных водах многих производств, а также являются естественными продуктами метаболизма растений, поэтому неудивительно, что метилотрофы широко распространены и постоянно обнаруживаются в ризосфере и филлосфере. Установлено, что метилотрофы являются фитосимбионтами, реализующими разные стратегии положительного влияния на рост и развитие растений. Для каждого региона характерны свои виды метилотрофных бактерий, адаптированных к определенным климатическим условиям. Однако нами выделены метилотрофы из различных удаленных географических регионов и обитающие в разных экологических нишах, но принадлежащие к одному виду.

Цель работы – определение филогенетического положения и характеристика новых метилотрофных изолятов, ассоциированных с растениями.

Из филлосферы и ризосферы растений Тульской области: клевера среднего (*Trifolium medium* L.), горошка мышиного (*Vicia cracca* L.), плодов моркови дикой (*Daucus carota* L.), падуба остролистного (*Ilex aquifolium* L.) (Крым), а также ягод красной смородины (Казань) и воздушных корней мангровых растений (Мальдивские острова), на среде «К» с 0.5% метанола выделены новые метилотрофные бактерии: штаммы Tul4, ViCr, Das, Padub, Rib и M52. Все исследуемые штаммы - ограниченно-факультативные метилобактерии, мезофилы, нейтрофилы, с температурными оптимума для роста 24-29 °С, оксидазо- и каталазоположительны, реализуют сериновый путь C_1 -метаболизма. Обнаружена способность всех изолятов синтезировать фитогормоны – ауксины (9-15 мкг/мл), солибилизировать фосфаты и стимулировать рост и развитие растений.

На основании секвенирования генов 16S рРНК все штаммы наиболее близки представителям рода *Methylopila* и имеют наибольшее сходство с *Mp.oligotropha* 2395A VKM В-2788^T (98.4-99.6%). Проведенная нами ДНК-ДНК гибридизация показала, что уровень гомологии между штаммом Das и *Mp.oligotropha* 2395A VKM В-2788^T составил только 50%, что дает основание отнести его к новому виду – *Methylopila fastidiosa* sp. nov. Напротив, остальные исследуемые штаммы имели уровни гомологии 75-80%, что указывает на их принадлежность к виду *Mp.oligotropha*, типовой представитель штамм 2395A^T выделен даже из засоленной почвы Соликамска (Пермский край).

Таким образом, новые выделенные метилотрофы из филлосферы и ризосферы растений являются фитосимбионтами, синтезирующими фитогормоны, солибилизирующими фосфаты и стимулирующими рост растений. Предложен новый вид рода *Methylopila* - *Methylopila fastidiosa* sp. nov. и показано, что вид *Mp.oligotropha* имеет широкое географическое распространение и обитает в различных эконишах.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-04-00381_a.

Новый аскомицет *Thielavia ovispora* - активный продуцент лакказ

Шебанова А.Д.^{1,2}, Самойлова А.С.¹, Головлева Л.А.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушино

²ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет»; anneteshebanova@mail.ru

Лакказа (бензендиол: кислород оксидоредуктаза, ЕС 1.10.3.2, “голубая” оксидаза) – медьсодержащий фермент, катализирующий одноэлектронное окисление широкого спектра субстратов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды (Мясоедова с соавт., 2015).

Наиболее изученными являются лакказы базидиальных грибов, но их ферменты обычно малоактивны при нейтральных и щелочных значениях pH, что препятствует их применению в ряде биотехнологических процессов. Лакказы аскомицетов на сегодняшний день изучены менее всего. В отличие от базидиальных грибов, аскомицеты способны быстрее расти и продуцировать лакказы на ранних сроках культивирования.

Лакказы являются одним из наиболее распространенных инструментов в современной биотехнологии для деградации ксенобиотиков, трансформации продуктов разложения лигнина, делигнификации и отбеливания растительного волокна, получения биологически ценных соединений (биополимеров, антиоксидантов, противоопухолевых препаратов, антибиотиков и др.), обесцвечивания красителей в стоках текстильного производства (Baldrian, 2006).

Красители трифенилметанового ряда являются синтетическими соединениями, широко используемыми в различных отраслях. Их удаление из сточных вод затруднено из-за высокой степени структурной сложности, что приводит к загрязнению окружающей среды.

Для разложения красителей используют разнообразные способы: озонирование, окислительные и фотохимические процессы, ионный обмен и электрохимическое разрушение. Некоторые из этих процессов позволяют достичь эффективного удаления красителя, однако, сопряжены с высокими эксплуатационными затратами и загрязнением окружающей среды. Поэтому биологические способы обесцвечивания красителей становятся все более востребованными в биоремедиации сточных вод (Robinson et al., 2001).

Оптимизированы условия погруженного культивирования аскомицета *Thielavia ovispora* с использованием природных источников углерода и энергии. Исследованы pH-оптимумы реакций окисления ряда фенольных субстратов лакказами культуральной жидкости гриба, а также их субстратная избирательность. Определены температурные оптимумы лакказ культуральной жидкости гриба *T. ovispora* и изучена стабильность лакказ в ходе инкубирования при различных температурах. Исследована pH-стабильность лакказ культуральной жидкости гриба в среде с pH 5.0 и 7.2 при двух температурах. Показана способность лакказ гриба *T. ovispora* обесцвечивать промышленные красители трифенилметанового ряда: малахитовый зелёный и бриллиантовый зелёный.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение №14.616.21.0001, RFMEF161614X0001).

Литература

1. Мясоедова Н. М., Гасанов Н. Б., Черных А. М., Коломыцева М. П., Головлева Л.А. Селективная регуляция продукции изоформ лакказы грибом *Lentinus strigosus* 1566.// Прикладная биохимия и микробиология – 2015 – том 51. № 2. с. 221–228;
2. Baldrian P. Fungal laccases – occurrence and properties.// FEMS Microbiol. Rev. – 2006 – Vol. 30. № 3. p. 215-242;
3. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.// Bioresource Technology – 2001– Vol. 77. p. 247–255.

Устойчивость интродуцированных микроорганизмов в открытой проточной системе

Шкидченко А.Н., Иванова А.А., Ветрова А.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино

Для осуществления технологических процессов биоремедиации создан и применяется ряд биопрепаратов, содержащих активные углеводородокисляющие микроорганизмы. При анализе процессов биоремедиации основное внимание уделяется, как правило, степени нефтедеструкции и редко подробно рассматривается судьба интродуцированных микроорганизмов - нефтедеструкторов. Отсутствие этой информации не позволяет оптимизировать восстановление нефтезагрязненных объектов.

Посевной материал выращивали отдельно в колбах Эрленмейера на среде Лурия-Бертани (LB) при 24°C на круговой качалке при 180 об/мин до титра 10^9 кл/мл и смешивали в пропорциональных соотношениях.

Для проведения работы была создана проточная система, состоящая из трех последовательно соединенных реакторов с рабочим объемом 1,5 л каждый. Для иммобилизации микроорганизмов использовали полиэтиленовый носитель типа «ерш». Перемешивание и аэрирование осуществляли потоком воздуха, подаваемого через керамические рассекатели, система культивирования была нестерильной.

Реакторы заполняли синтетической питательной средой, не содержащей в своем составе источника углерода, (г/л): NH_4Cl - 2,5; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{FeSO}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01; NaCl - 5,0; Na_2HPO - 10,0; KH_2PO - 1,0.

При длительном непрерывном культивировании интродуцированных микроорганизмов - нефтедеструкторов и сопутствующей микрофлоры процесс оставался стабильным во времени, но отличался в каждом из трех реакторов.

В первом биореакторе дизельное топливо, подававшееся в качестве источника углерода, потреблялось полностью. Его концентрация на выходе из реактора составляла 0,0008 мг/л, что соответствует уровню пороговой концентрации, характерному для хемотрофного культивирования. Общий титр гетеротрофной микрофлоры, находящейся в культуральной жидкости, составлял $6,0 \times 10^8$ кл/мл (табл.1), при этом доля нефтедеструкторов достигала 34% от общей численности.

Табл. 1.

Численность микроорганизмов в биореакторах

№ биореактора	Точка отбора проб	Общая численность гетеротрофов	Численность нефтедеструкторов	Доля нефтедеструкторов, %
1	среда	6.0×10^8 кл/мл	2.0×10^8 кл/мл	33.3
2	Среда носитель	8.5×10^8 кл/мл 4.6×10^{11} кл/г	2.3×10^8 кл/мл 8.3×10^{10} кл/г	27.0 18.0
3	Среда носитель	8.4×10^7 кл/мл 8.8×10^{10} кл/г	2.4×10^7 кл/мл 1.7×10^{10} кл/г	18.0

Культуральная жидкость с клетками микроорганизмов поступала по принципу сообщающихся сосудов во второй реактор. Дополнительно, в качестве субстрата, туда подавалась водная эмульсия нефти, которая распределялась по всему объему биореактора. Общая численность микроорганизмов в жидкой фазе возрастала во втором реакторе до $8,5 \times 10^8$ кл/мл, количество нефтедеструкторов оставалось на прежнем уровне и составляло 27%. Титр гетеротрофной микрофлоры, иммобилизованной на носителе, составлял $4,6 \times 10^{11}$ кл/г. При этом численность нефтедеструкторов была менее 20%.

Полной утилизации нефтепродуктов не происходило и в третьем биореакторе. Соотношение между численностью нефтедеструкторов и гетеротрофных микроорганизмов в реакторе оставалось на прежнем уровне как в свободном, так и иммобилизованном состоянии. Поскольку система культивирования была открытой и нестерильной, то в реакторах помимо интродуцированных штаммов нефтедеструкторов присутствовала аборигенная микрофлора. Анализ данных специализированного мониторинга показал, что численность интродуцированных бактерий превышала численность аборигенных микроорганизмов как в свободном, так и иммобилизованном состоянии.

В первом реакторе в культуральной жидкости внесенные микроорганизмы составляли 65% от общей численности нефтедеструкторов, во втором реакторе их количество снижалось до уровня 55%, а в третьем - превышало 80%. Один из внесенных штаммов *Pseudomonas putida* КТ2442 оказался неконкурентоспособным в открытой системе и уже по истечении 24 часов не обнаруживался. Доля штамма *Pseudomonas aureofaciens* 1393 колебалась на уровне 3 - 14% общей численности интродуцированных микроорганизмов. Соотношение двух других интродуцированных штаммов в системе изменялось. Так, содержание штамма *Rhodococcus erythropolis* Sh5 составляло в первом и втором реакторах 67 - 75% как в жидкой фазе, так и на носителе. Однако, в третьем реакторе доля *Microbacterium lequefaciens* Ash10(2) возрастала до 54 - 57%. Вероятно, что этот штамм обладал более низким K_s по субстрату и в условиях его исчерпания в третьем реакторе получал преимущество в росте.

Таким образом, применение многостадийного непрерывного культивирования в системе из трех биореакторов, позволило создать устойчивую ассоциацию нефтедеструкторов, в которой доминировали интродуцированные штаммы, составлявшие до 83% всех углеводородокисляющих микроорганизмов.

Галоалкалофильный метилотроф *Methylophaga muralis* Bur 1, выделенный из содового озера Хилганта (Южное Забайкалье, республика Бурятия)

Шмарева М. Н., Доронина Н. В., Тарлачков С. В., Василенко О. В., Троценко Ю. А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пущино; poroshinam@rambler.ru

Области с экстремальными физико-химическими показателями представляют собой предмет научного интереса ученых, в том числе микробиологов. Аридный климат Забайкалья способствует образованию содово-соленых озер, в которых активно функционирует алкалофильное сообщество. Озеро Хилганта, расположенное в Южном Забайкалье (50° 42' 535" с. ш., 115° 06' 086" в. д.), принадлежит к этому типу водоемов: является соленым (минерализация 40‰) содовым (рН = 9.6), а также мелководным (0.7–0.8 м), пересыхающим или частично опресняющимся в течение года водоемом, что влечет за собой значительную сезонную лабильность всех физико-химических показателей.

Цель работы – таксономическая, физиолого-биохимическая и геномная характеристика нового изолята галоалкалофильного метилотрофного штамма Bur 1.

Изолят Bur 1 представлен грамтрицательными подвижными палочками, 0.5–0.7 × 1.2–2.5 мкм. Спор и протек не образует. Ауксотрофен по витамину В₁₂. В качестве источников углерода и энергии использует метанол, монометиламин и фруктозу; слабый рост отмечен на диметилаmine и триметилаmine. В качестве источников азота использует нитраты, аммоний и метиламин. Не способен к автотрофному росту. Штамм образует экзополисахарид (115 г/100 г сухого вещества биомассы).

В жидкой среде растет при температуре 4–37°C, рН 7.5–10.5, 0.5–10.0% NaCl, оптимально при 25–29°C, рН 8.5–9.5 и 3–4% NaCl, что позволяет считать штамм Bur 1

умеренным галоалкалофилом. Анализ внутриклеточного содержания осмопротекторов в зависимости от концентрации NaCl в среде показал, что при культивировании штамма Bur 1 при 2% NaCl в среде обнаружен только глутамат, при увеличении солености до 4% – накапливается также эктоин, а при 6–8% NaCl, наряду с увеличением содержания глутамата и эктоина, клетки накапливали сахарозу.

Результаты энзимологического анализа клеток, выращенных на метаноле, показали наличие активностей ферментов окисления метанола, формальдегида и формиата. Изолят реализует РМФ-путь C₁-ассимиляции; аммоний ассимилирует через глутаматный цикл и восстановительным аминированием α-кетоглутарата. Штамм Bur 1 не имеет активностей фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы и α-кетоглутарат дегидрогеназы; следовательно, цикл Кребса – неполный. Обнаружены активности ферментов биосинтеза осмопротектора эктоина – эктоин синтазы, диаминобутират аминотрансферазы и диаминобутират ацетилтрансферазы, что свидетельствует о *de novo* синтезе организмом эктоина.

Обнаружено, что штамм Bur 1 имеет высокое сходство нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (94.7–99.1%) с представителями рода *Methylophaga*, и максимальное значение сходства выявлено с *M. muralis* Kr3^T. По результатам ДНК-ДНК гибридизации с типовыми представителями рода, сходство составляет 24–74%, максимальное сходство выявлено с *M. muralis* Kr3^T, что указывает на принадлежность штамма к данному виду. На основании полученных результатов изолят идентифицирован как *Methylophaga muralis* Bur 1.

Проведена сравнительная характеристика генома *M. muralis* Bur 1 с известными представителями рода. Размер генома *M. muralis* Bur 1 составил 2846920 прочитанных оснований (покрытие×75). После сборки генома в общей сложности было получено 130 контигов с N₅₀=76869 п.н., средняя длина контига составила 21.9 т.п.н. Геном *M. muralis* Bur 1 содержал 2817 белок-кодирующих генов. Идентифицированы 3 рРНК (5S, 16S и 23S рРНК) и 38 тРНК. Предсказаны 634 белка с неопределенными функциями. Взаимное сходство геномов представителей рода *Methylophaga* составило 71–72%. Интересно отметить, что общее количество генов и белок-кодирующих генов у *M. muralis* Bur 1 сопоставимо с таковым у *M. lonarensis*, однако значение Г+Ц состава совпадает с таковым у *M. nitratireducenticrescens* (44.7%). Определен кластер генов *mxhFJGIRSACKLDEH*, ответственный за окисление метанола; обнаружен *hoxF* (WP_069296575), аминокислотная последовательность которого проявила 64% сходства с последовательностью *hoxF* *Methylobacterium extorquens* AM1^T (ACS40517).

Обнаружен кластер генов, участвующих в биосинтезе пирролохинолинхинона (*pqqBCDE*) и гены ТГМП-зависимого превращения формальдегида (*fae, fold, purU, fhcABCD, fch*). Идентифицированы гены, кодирующие ферменты биосинтеза эктоина, организованные в типичный для гало(алкало)фильных метиловых бактерий кластер *ectABC-ask* и ген-регулятор *ectR*. Обнаружен кластер генов *sps-spp-fruK-ams*, отвечающий за биосинтез сахарозы. Обнаружены гены метиламин дегидрогеназы *mauED/ADEBF*, представленной амицианином. Детектирован оперон, кодирующий ферменты N-метилглутаматного (НМГ) пути: *mgsABC, mgdABCD, soxABDG, gmaS*.

Таким образом, *M. muralis* Bur 1, вероятно, играет важную роль в солено-содовом водоеме, возвращая углерод C₁-соединений в общий пул органического вещества, а также участвуя в денитрификации. Жизнь в подобных экосистемах с высокой степенью минерализации и рН невозможна без участия особых механизмов, позволяющих микроорганизмам активно функционировать в условиях солевого и щелочного стресса. *M. muralis* Bur 1 весьма приспособлен к существованию при постоянно изменяющихся значениях рН, осмолярности среды и температуры, поскольку растет при 4–37°C, рН 7.5–10.5, 0.5–10.0% NaCl, синтезирует ряд осмопротекторов: полисахарид, глутамат, сахарозу, а также химический шаперон – эктоин. Это позволяет считать данный организм постоянным и метаболически активным обитателем водоема.

Научное издание

**IV ПУЩИНСКАЯ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ
«БИОХИМИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ
И БИОСФЕРНАЯ РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ»**

Материалы конференции

Авторское редактирование

Подписано в печать 01.12.17.
Формат бумаги 70x100¹/₁₆. Бумага офсетная.
Тираж 50 экз. Заказ 114744.

Отпечатано в типографии «Юлис».
г. Тамбов, ул. Монтажников 9
г. Москва, ул. Гостиничный проезд, 4б, подъезд 3 «а»