

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук  
ФГУ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии  
Российской академии наук  
Межрегиональное Микробиологическое Общество

# **I й Российский Микробиологический конгресс**

17-18 октября 2017

**Материалы конгресса**

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

I й Российский Микробиологический конгресс: сборник тезисов/под редакцией д.б.н.  
Решетиловой Т.А. Москва: ООО «ИД «Вода: химия и экология», 2017. 190 стр.

ISBN 978-5-9909335-1-4

В сборнике представлены тезисы устных и постерных сообщений по материалам работы 1-го Российского Микробиологического Конгресса. Цель Конгресса - широкий обмен информацией в области микробиологии и смежных дисциплин. Рассматривается филогенетическое и метаболическое разнообразие микроорганизмов, их распространение, включая в слабоизученных экстремальных экосистемах, генетические, биохимические и структурно-функциональные особенности микроорганизмов, новые методы исследования, биотехнологические разработки. Изучение микробного разнообразия и его ресурсов, микробного метаболизма и его генетических детерминант является фундаментом генерации новых фундаментальных знаний в области биологии и создания принципиально новых технологий.

В работе Конгресса приняли участие более 300 исследователей из 60 научных организаций, высших учебных заведений, производственных компаний многих регионов России.

УДК 579.22  
ББК 28.4

ISBN 978-5-9909335-1-4

© Авторы тезисов, 2017  
© ООО «ИД «Вода: химия и экология»

# СОДЕРЖАНИЕ

Содержание .....	3
<b>Пленарные доклады</b>	
Новые горизонты в исследованиях планктомицетов <i>Дедыш С.Н.</i> .....	17
Микробиотехнологии для стероидной фарминдустрии: новые биопроцессы, проблемы и перспективы <i>Донова М.В.</i> .....	17
Фармполлютанты как новая разновидность эмерджентных загрязнителей природной среды: поиск путей их детоксикации и биодеградации <i>Ившина И.Б.</i> .....	18
Коллекции микроорганизмов: взгляд в будущее <i>Калакуцкий Л.В.</i> .....	19
Экосистемы Сибири – источник новых изолятов некультивируемых ранее Bacteria <i>Карначук О.В.</i> .....	20
Функции и механизмы действия вторичных метаболитов цианобактерий <i>Кокшарова О.А.</i> .....	20
Метагеномика и геномика единичных клеток для микробиологии <i>Марданов А.В., Кадников В.В., Равин Н.В.</i> .....	21
Вид у прокариотов: общая проблематика и история с цианобактериями <i>Пиневиц А.В.</i> .....	21
Обмен сигналами между растениями и микроорганизмами, обеспечивающий высокоспецифичный симбиоз <i>Тихонович И.А.</i> .....	22
Омикс-технологии и определение бактериального резистома: молекулярные основы адаптации к антимикробным препаратам у молликут <i>Чернов В.М., Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Малыгина Т.Ю., Синягина М. Н., Булыгина Е.А., Чернова О.А.</i> .....	23
<b>Секция: Микробное разнообразие микроорганизмов</b>	
Длинноволновые хлорофиллы цианобактерий <i>Аверина С.Г., Сенатская Е.В., Пиневиц А.В.</i> .....	24
Метаболический коэффициент и содержание микробной биомассы в разновозрастных почвах хроносерии подзолов, формирующихся на отвалах карьера по добыче водноледниковых песков Ленинградской области <i>Алексеев И.И., Дмитракова Я.А., Абакумов Е.В., Иванова Е.А.<sup>3</sup>, Першина Е.В., Кимеклис А.К., Зверев А.О., Поляков В.И.</i> .....	24
Эволюция почвенного микробиома, контролируемая растением <i>Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Кимеклис А.К., Чирак Е.Р., Копать В.В., Проворов Н.А.</i> ....	25
Углеводный состав микробных матов гидротерм Байкальской рифтовой зоны <i>Бархутова Д.Д., Будагаева В.Г., Раднагуруева А.А., Лаврентьева Е.В., Дмитриева О.М., Оленников Д.Н.</i> .....	26
Подледные микробные сообщества озера Байкал <i>Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П., Галачьянц Ю.П., Ханаев И.В., Сакирко М.В., Лихошвай Е.В.</i> .....	26
Деструктивная активность аспергиллов, выделенных из различных экологических ниш <i>Баязитова А.А., Надеева Г.В., Яковлева Г.Ю., Ильинская О.Н.</i> .....	27

Структура и активность метанового фильтра лесотундры Ямала и факторы его дестабилизации <i>Белова С.Э., Данилова О.В., Гагарина И.В., Дедыш С.Н.</i> .....	28
Бентосные микроцистин-продуцирующие цианобактерии в озере Байкал <i>Белых О. И., Сорокикова Е. Г., Ивачева М. А., Тихонова И. В., Кузьмин А. В., Федорова Г. А.</i> .....	29
Микробиоценоз байкальских эндемичных губок <i>Lubomirskia baicalensis</i> в норме и патологии <i>Белькова Н.Л., Деникина Н.Н., Мартынова-Ван Клей А., Феранчук С.И., Беликов С.И.</i> .....	30
Разнообразие кишечных микробиоценозов на ранних стадиях развития байкальских сиговых рыб и их гибридов F1 <i>Белькова Н.Л., Сидорова Т.В., Феранчук С.И., Глызина О.Ю., Яхненко В.М., Сапожникова Ю.П., Смирнов В.В., Смирнова-Залуми Н.С., Суханова Л.В.</i> .....	30
Алкалофильные грибы в засоленных местообитаниях <i>Бондаренко С.А., Георгиева М.Л., Януцевич Е.А., Терешина В.М., Биланенко Е.Н.</i> .....	31
Зараженность мицелиальными грибами приморского гребешка <i>Mizuhopecten yessoensis</i> в заливе Петра Великого Японского моря <i>Борзых О. Г., Зверева Л. В.</i> .....	32
Сульфатредуцирующие бактерии в аэробных водах Чёрного моря <i>Брюханов А.Л., Захарова Е.Е., Пименов Н.В.</i> .....	33
Биопленкообразование <i>Listeria monocytogenes</i> с микроорганизмами, выделенными из пищеварительного тракта мидии грея ( <i>Grenomytilus grayanus</i> ) и морской воды <i>Бузолева Л.С., Ким А.В., Еськова А.И.</i> .....	33
Возрастные изменения микробиома отделов респираторного тракта пациентов с муковисцидозом <i>Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Шаранова Н.Е., Кондратьева Е.И., Гинцбург А.Л.</i> .....	34
Разнообразие фототрофных бактерий в цианобактериальных матах гидротермальных источников Алла и Умхей (Баргузинская долина) <i>Гайсин В.А., Бурганская Е.И., Груздев Д.С., Рысина М.С., Брянцева И.А., Бархутова Д.Д., Патутина Е.О., Горленко В.М., Кузнецов Б.Б.</i> .....	34
Роль эндофитных бактерий в фитобиоме <i>Гарипова С.Р., Умаров М.М.</i> .....	35
Молекулярная экология и биогеография магнитотактических бактерий <i>Груздев Д.С., Козяева В.В., Узун М.М., Ракова А.И., Рысина М.С.</i> .....	36
Структура микробных сообществ лесных, пахотных и постагрогенных серых лесных почв <i>Груздев Д.С., Рысина М.В., Кравченко И.К.</i> .....	37
Микробиологические параметры молодых почв отвалов карьера по добыче известняков, Ленинградская область <i>Дмитракова Я.А., Абакумов Е.В., Иванова Е.А, Першина Е.В, Кимеклис А.К., Зверев А.О.</i> .....	37
Структурно-функциональные перестройки микроорганизмов при адаптации к экстремальным факторам внешней среды <i>Дмитриев В.В., Звонарев А.Н.</i> .....	38
Новые вид и подвид рода <i>Agreia</i> из галлов, индуцированных на растениях нематодами подсемейства <i>Anguininae</i> <i>Дорофеева Л.В., Присяжная Н.В., Стародумова И.П., Тарлачков С.В., Василенко О.В., Чижев В.Н., Субботин С.А., Евтушенко Л.И.</i> .....	39
Соотношение С/N/P в биомассе почвенных микроорганизмов как показатель адаптации микробного сообщества к абиотическим стрессам <i>Дударева Д.М., Евдокимов И.В.</i> .....	39

Почвенно-микробиологические подходы к реконструкции исходного содержимого ритуальных сосудов археологических памятников <i>Дущанова К.С., Хомутова Т.Э., Борисов А.В.</i> .....	41
Изучение матрикса биопленки, образованной <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245, методом ИК-фурье-спектроскопии <i>Дятлова Ю.А., Камнев А.А., Евстигнеева С.С., Федоненко Ю.П., Тугарова А.В.</i> .....	41
Актинобактерии: эволюция парадигмы и современное состояние исследований <i>Евтушенко Л.И.</i> .....	42
Влияние бессменного выращивания льна-долгунца на микробиологическое сообщество почвы <i>Ефремов Г.И.</i> .....	43
Изменения микробиома в процессе первичного почвообразования в тундровой зоне <i>Железова А. Д., Чернов Т. И., Тхакахова А. К., Бгажба Н. А., Кутовая О. В.</i> .....	43
Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал <i>Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В., Пименов Н.В.</i> .....	44
Влияние кратковременных и длительных засух на активность гидролитических ферментов в серой лесной почве <i>Журавлева А.И., Якушев А., Кузнецова И.Н., Благодатская Е.В.</i> .....	45
Синтрофное взаимодействие алкалофильных анаэробных бактерий <i>Geoalkalibacter ferrihydriticus</i> и <i>Candidatus Contubernalis alkalaceticum</i> <i>Заварзина Д.Г., Чистякова Н.И., Грачева М.А., Антонова А.В., Чернов М.С., Меркель А., Жилина Т.Н.</i> .....	45
Экология подледных микробных сообществ уникальных озёр Якутии (оз. Лабынкыр, оз. Ворота) <i>Захарова Ю.Р., Башенхаева М.В., Копырина Л.И., Лихошвай Е.В.</i> .....	46
Микроорганизмы, участвующие в процессе восстановления железа в низкотемпературных экосистемах <i>Захарюк А.Г., Щербакова В.А.</i> .....	47
Анализ устойчивости к антимикробным препаратам колиформных бактерий, выделенных из поверхностных водных объектов г. Рязани <i>Зацаринная Е.А., Ефремова Е.С., Гаськова А.С., Калчугина В.Д., Трунякова А.С.</i> .....	48
Разнообразие микроорганизмов-нефтедеструкторов Финского залива Балтийского моря в зимний и летний период <i>Измалкова Т.Ю., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Соколов С.Л., Кошелева И.А.</i> .....	48
Активность и разнообразие аэробных метанотрофов в покрывающей почве подземного хранилища газа <i>Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Снакин В.В., Доронин А.В., Тарновецкий И.Ю., Власов С.В., Пименов Н.В.</i> .....	49
Природное разнообразие углеводородокисляющей микробиоты нефтезагрязненных объектов как основа биоремедиации <i>Карасева Э.В., Худокормов А.А., Карасев С.Г., Самков А.А., Волченко Н.Н., Лень Н.Н., Мамонтова Ю.А., Ярыш И.А.</i> .....	50
Влияние азота на сопряженную трансформацию микробным сообществом почвы органического вещества и глинистых минералов <i>Квиткина А.К., Алексеева Т.В.</i> .....	51
Подавление роста культуры <i>Aspergillus niger</i> растворами солей тяжелых металлов на разных стадиях обработки <i>Клюева В.В., Клюев А.С., Сиротин А.А., Ляховченко Н.С.</i> .....	51

Почвенные микроорганизмы как компонент постагрогенных экосистем в тундровых ландшафтах <i>Ковалева В.А.</i> .....	52
Микробные сообщества содовых и соленых озер Забайкалья: разнообразие и функционирование <i>Козырева Л.П., Зайцева С.В., Абидуева Е. Ю., Бурюхаев С.П., Кабилов М.Р.</i> .....	53
Микроорганизмы вечной мерзлоты и их биотехнологический потенциал <i>Комолова А.О., Спирина Е.В., Соколова Е.М., Ривкина Е.М.</i> .....	54
Микробные сообщества горячих источников Чукотки <i>Кочеткова Т.В., Заюлина К.С., Ельченинов А.Г., Елизаров И.М., Гаврилов С.Н., Заварзина Д.Г., Воитова М.П., Фролов Е.Н., Меркель А.Ю., Тоцаков С.В., Кубланов И.В.</i> .....	54
Плазмиды псевдомонад <i>Кошелева И.А., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Боронин А.М.</i> .....	55
Микробное разнообразие образцов позднеплиоценовых – раннеплейстоценовых многолетнемерзлых грунтов Сибири <i>Кудряшова Е.Б., Арискина Е.В., Карлышев А.В.</i> .....	56
Структурно - функциональная характеристика микробных сообществ колонизирующих скальные поверхности пещеры Шульган-Таш (Южный Урал) <i>Кузьмина Л.Ю., Червяцова О.Я., Галимзянова Н.Ф., Леонова Л.В., Рябова А.С., Сафаров И.М.</i> .....	56
Микробиологический профиль погребенных почв (по данным ПЦР Real-Time) повторяет статус зональных аналогов <i>Кутовая О.В., Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Железова А.Д., Бгажба Н.А.</i> .....	57
Филогенетическое разнообразие и экологическая роль прокариот в экстремальных природных экосистемах Внутренней Азии <i>Лаврентьева Е.В., Раднагуруева А.А., Эрдынеева Е.Б., Бархутова Д.Д., Зайцева С.В., Коцюрбенко О.Р.</i> .....	58
Разнообразие микробных сообществ в осадках озера Байкал, характеризующихся различным составом разгружающихся флюидов <i>Ломакина А.В., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Захаренко А.С., Погодаева, Галачьянц Ю.П., Земская Т.И.</i> .....	59
Микрофлора воздуха городской антропоэкосистемы <i>Лыков И.Н.</i> .....	59
Разнообразие фильтрующихся форм прокариот в почве и почвенных конкрециях <i>Лысак Л.В., Соина В.С., Лапыгина Е.В., Кудинова А.Г.</i> .....	60
Дрожжи в микобиоте виноградников Дагестана <i>Магомедова Е.С., Абдуллабекова Д.А., Аливердиева Д.А.</i> .....	61
АТСС – мировая коллекция штаммов, клеточных линий и других биоресурсов для контроля качества и научных исследований <i>Марек Примик.</i> .....	62
Грибы приземных слоев воздуха (численность, динамика, разнообразие) <u>Марфенина О.Е.</u> <i>Колосова Е.Д.</i> .....	62
Особенности структуры и разнообразия микробных матов меромиктического содового озера Доронинское (Забайкалье) <i>Матюгина Е.Б., Белькова Н.Л.</i> .....	63
Генетически дивергентные внутривидовые популяции дрожжей <i>Saccharomyces</i> и <i>Kluyveromyces</i> в статусе разновидностей: геномика, экология и биогеография <i>Наумов Г.И., Боровкова А.Н., Лютова Л.В., Наумова Е.С.</i> .....	64

Численность копий генов грибов и ферментативная активность микромицетов почв Антарктиды <i>Никитин Д.А., <u>Марфенина О.Е.</u> Бирюков М.В., Железова А.Д., Тхакахова А.К.</i> .....	64
Сезонная динамика микробной биомассы в почве на разных глубинах <i>Никитин Д.А., Чернов Т.И., Железова А.Д., Тхакахова А.К., Бгажба Н.А., Семенов М.В., Кутовая О.В.</i> .....	65
Численность грибов и ферментативная активность микромицетов почв Антарктиды <i>Никитин Д.А., <u>Марфенина О.Е.</u> Бирюков М.В., Железов А.Д.</i> .....	65
Эпидемиологически опасная микрофлора, выделяемая от птиц <i>Новикова О.Б.</i> .....	66
Роль бактериальных гликозил-гидролаз во взаимодействии фитопатогенных пектобактерий с растениями <i>Нуриахметова Ч.Б., Ковтунов Е.А., Даминова А.Г., Гоголев Ю.В., Горшков В.Ю.</i> .....	67
Социальная организация микроорганизмов и взаимодействия в системе микробиота - хозяин: роль нейромедиаторов <i>Олескин А.В., Водолазов И.Р.</i> .....	67
Микроценозы клоновых культур морских токсичных динофлагеллят <i>Орлова Т.Ю., Каменева П.А., Беленева И.А., Ефимова К.А., Карпенко А.А., Зинов А.А.</i> .....	68
Микроорганизмы озера Байкал: от психрофильных углеводородокисляющих аэробов до термофильных миксотрофов <i>Павлова О.Н., Букин С.В., Горшков А.Г., Ханаева Т.А., Земская Т.И.</i> .....	68
Микробные сообщества лишайников субарктической зоны России: структура и особенности локализации <i>Панкратов Т.А., Качалкин А.В.</i> .....	69
Почвенный микробиом – уникальный природный ресурс России <i>Першина Е.В., Андронов Е.Е.</i> .....	70
Изучение структуры биоПАВ, синтезируемых микроорганизмами, выделенными 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> .....	71
Микробиология мелководных метановых сипов Черного моря <i>Пименов Н.В., Канапацкий Т.А., Малахова Т.В., Тарновецкий И.Ю., Меркель А.Ю., Гулин М.Б.</i> .....	71
Разнообразие прокариотических и эукариотических микроорганизмов в соленых и солоноватых водоемах Южного Урала на основе высокопроизводительного метагеномного секвенирования <i>Плотников А.О., Селиванова Е.А., Пошвина Д.В., Хлопко Ю.А., Черкасов С.В.</i> .....	72
Биологическая активность почвы при обработках гербицидами сорной растительности в питомниках декоративных культур <i>Полякова Н.Н., Сидоренко О.Д., Белошапкина О.О., Серая Л.Г.</i> .....	73
Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий подпорядка <i>Micrococcineae</i> : структурное разнообразие, таксономические и экологические аспекты <i>Потехина Н.В., Стрешинская Г.М., Тульская Е.М., Евтушенко Л.И.</i> .....	74
Микробная активность и разнообразие прокариот в кислых горячих источниках кальдеры Узон <i>Прокофьева М.И., Русанов И.И., Пименов Н.В., Меркель А.Ю., Равин Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А.</i> .....	74
Гены нерибосомальных пептидаз и поликетидсинтаз стрептомицетов, выделенных из озера Байкал <i>Протасов Е.С., Аксенов-Грибанов Д.В., Войцеховская И.В., Тимофеев М.А.</i> .....	75
Коллекция культур базидиомицетов LE-BIN: проблемы сохранения и перспективы использования штаммов	

<i>Псурцева Н.В.</i> .....	76
Микробные процессы циклов углерода и серы в пресноводном мероклиматическом озере Светлое (Архангельская область) <i>Саввичев А.С., Кокрятская Н.М., Русанов И.И., Лунина О.Н., Б.Б. Кузнецов, В.М. Горленко</i> .....	77
Микроорганизмы–деструкторы ПАУ, колонизирующие листовые пластинки древесных растений урбанизированных территорий <i>Сазонова О.И., Соколов С.Л., Измалкова Т.Ю., Кошелева И.А.</i> .....	77
Оценка действия детонационных наноалмазов на почвенные бактерии <i>Сафронова Н. А., Кокшарова О. А., Хмель И. А., Куликова Н. А.</i> .....	78
Микромицеты – продуценты лакказ в почвах зонального ряда и поиск штаммов, способных к деструкции гуминовых веществ <i>Семенова Т.А., Лисова З.А., Лисов А.В., Заварзина А.Г.</i> .....	79
Таксономическая структура микробных сообществ серой лесной почвы склонового ландшафта <i>Семенов М.В.</i> .....	79
Влияние возрастающих концентраций синтетических поверхностно-активных веществ на развитие цианобактерии <i>Nostoc paludosum</i> <i>Симакова В.С., Домрачева Л.И.</i> .....	80
Хранение актиномицетов редких родов методом низкотемпературного замораживания <i>Синёва О.Н., Терехова Л.П.</i> .....	81
Новые термофильные хемолитоавтотрофные микроорганизмы, использующие соединения серы <i>Слободкина Г.Б., Слободкин А.И.</i> .....	82
Устойчивость к антибиотикам бактерий, выделенных из почв и осадков экстремальных местообитаний <i>Соина В.С., Петрова М.А., Максакова С.А., Белов А., Воробьева Е.А.</i> .....	82
Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий рода <i>Rhazobium</i> <i>Стрешинская Г.М., Тульская Е.М., Потехина Н.В., Шашков А.С., Дмитренко А.С., Сенченкова С.Н., Дорофеева Л.В., Стародумова И.П., Евтушенко Л.И.</i> .....	83
Обнаружение бактериофагов в подземных льдах Арктики <i>Сургучева Н.А., Филиппова С.Н., Гальченко В.Ф., Брушков А.В., Рогов В.В.</i> .....	84
TaxonDC: программа для расчета сходства последовательностей генов 16S рРНК или ITS-регионов грибов <i>Тарлачков С.В., Стародумова И.П.</i> .....	85
Оценка разнообразия микробных сообществ почв по липидным маркерам: возможности и ограничения <i>Терехова В.А., Верховцева Н.В., Федосеева Е.В., Розенцвет О.А.</i> .....	85
Встречаемость колиформных бактерий в поверхностных водных объектах города Рязани <i>Трунякова А.С., Зацаринная Е.А.</i> .....	86
Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 <sup>Т</sup> и <i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1371 <i>Тульская Е.М., Ким Д., Стрешинская Г.М., Шашков А.С., Дмитренко А.С., Сенченкова С.Н., Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И.</i> .....	87
Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: история и перспективы <i>Турковская О.В.</i> .....	88
Антагонистическая активность <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Фарофонова В.В., Стародумова И.П., Присяжная Н.В., Томашевская М.А.</i> .....	88
' <i>Desulfothermobacter acidiphilus</i> ' gen. nov., sp. nov. новая термоацидофильная сульфатредуцирующая бактерия из термального источника полуострова Камчатка <i>Фролов Е.Н., Черных Н.А.</i> .....	89



Биоразнообразие экстремофильных микробных сообществ Терско – Кумской низменности (Республика Дагестан) <i>Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А, Аливердиева Д.А.</i> .....	90
Летучие органические соединения, синтезируемые бактериями: функциональная и экологическая роль <i>Хмель И.А., Кокшарова О.А., Попова А.А., Плюта В.А.</i> .....	91
Разнообразие ассоциативных микроорганизмов и специфика микробно-растительных взаимодействий с эпифитными орхидными <i>Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Креницына А.А., Леонтьева М.А., Нетрусов А.И.</i> .....	91
Структура микробных сообществ в профилях черноземов 120-летнего полевого эксперимента на основе анализа гена 16S рРНК <i>Чернов Т.И., Семенов М.В, Тхакахова А.К., Железова А.Д. Кутовая О.В.</i> .....	92
О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса <i>Щеголев С. Ю.</i> .....	93
Полярные прокариоты в фонде Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) <i>Щербакова В.А.</i> .....	93
Биоразрушение строительных конструкций, индуцируемое микромицетами <i>Яковлева Г.Ю, Халмурадова П.А., Сагадеев Е.В., Стrogанов В.Ф., Ильинская О.Н.</i> .....	94
Экофизиологические особенности бактериальных комплексов кишечника диплопод различных трофических групп <i>Якушев А. В.</i> .....	94
<b>Секция: Метаболизм и геномика микроорганизмов</b>	
Скрининг генов синтеза бактериоцинов среди культур <i>Enterococcus</i> spp. <i>Абаимова А.А., Теймуразов М.Г., Светоч Э.А., Фурсова Н.К.</i> .....	95
Полногеномный сиквенс и метиломный анализ пресноводной бесцветной серобактерии “ <i>Thioflexothrix psekiusii</i> ” D3 <i>Белоусова Е.В., Орлова М.В., Фоменков А.И., Грабович М.Ю.</i> .....	96
Молекулярные маркеры нозокомиальных инфекций <i>Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.</i> .....	97
Биологическое действие наночастиц металлов в сочетании с синтетическими пептидами на клинические штаммы микроорганизмов <i>Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.</i> .....	97
Влияние специфического бактериофага на везикулообразование и морфологию клеток <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> <i>Бывалов А.А., Малкова М.А., Дудина Л.Г.</i> .....	98
Исследование механизмов первичных процессов фотосинтеза в реакционных центрах пурпурных несерных бактерий: направленный мутагенез, расшифровка кристаллической структуры, оптическая спектроскопия <i>Васильева Л.Г, Фуфина Ф.Ю., Селиханов Г.К., Габдулхаков А.Г., Хатыпов Р.А., Забелин А.А., Шкуропатов А.Я., Шувалов В.А.</i> .....	99
Транскриптомные, протеомные и ультраструктурные перестройки в процессе онтогенеза базидиомицета <i>Lentinus edodes</i> <i>Ветчинкина Е.П., Купряшина М.А., Губаев Р.Ф., Горшков В.Ю., Гапа Л.М., Гоголева Н.Е., Агеева М.В., Гоголев Ю.В., Никитина В.Е.</i> .....	99
Особенности системы секреции III типа российских эпидемических штаммов <i>Burkholderia cenocepacia</i> ST709 и <i>Achromobacter ruhlandii</i> ST36 <i>Воронина О.Л., Кунда М.С., Шаранова Н.Е., Гинцбург А.Л.</i> .....	100

Новые геномные детерминанты дыхательного метаболизма у экстремофильных архей <i>Гаврилов С.Н., Слободкин А.И., Сорокин Д.Ю., Елизаров И.М., Марданов А.В., Гольшиина О.В., Тоцаков С.В., Кубланов И.В.</i> .....	101
Особенности анаэробного функционирования цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта у штаммов <i>Escherichia coli</i> дефицитных по основным путям брожения <i>Гулевич А.Ю., Скорородова А.Ю., Дебабов В.Г.</i> .....	102
Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса ризобий <i>Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Симахина А., Баймиев А.Х.</i> .....	102
Зачем бактериям протеализинподобные протеазы? <i>Демидюк И.В., Чухонцева К.Н., Костров С.В.</i> .....	103
Субстрат и хелатор: участие ксилана в процессе восстановления нерастворимых соединений трехвалентного железа <i>Елизаров И.М., Лопатин С.А., Заюлина К.С., Кубланов И.В., Гаврилов С.Н.</i> .....	103
Реконструкция катаболизма углеводов термофильного представителя планктомицетов <i>Thermogutta terrifontis</i> с использованием геномного и транскриптомного подходов <i>Ельченинов А.Г., Menzel P., Gudbersdottir S.R., Krogh A., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В.</i> .....	104
Гипертермофильные археи-гидролитики из горячих источников Кунашира и Чили <i>Заюлина К.С., Гаврилов С.Н., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В.</i> .....	105
Новый взгляд на механизм автотрофной ассимиляции CO <sub>2</sub> через восстановительный цикл трикарбоновых кислот. Функция цитратсинтазы в автотрофной ассимиляции CO <sub>2</sub> у зелёных серных бактерий <i>Ивановский Р.Н., Лебедева Н.В.</i> .....	106
Микробиом кишечника пациентов с диагностированным колоректальным раком <i>Ильинская О.Н., Нгуен тхи Нга, Гатауллин И.Г.</i> .....	106
Открытие способности микоплазм к образованию цист <i>Клемяшов И.В.</i> .....	107
Механизмы антибактериального действия варнерина - низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков <i>Коробов В.П., Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Ерошенко Д.В., Кононова Л.И., Лихацкая Г.Н.</i> .....	108
Новые липолитические ферменты из библиотеки метагеномной ДНК микробного сообщества вечной мерзлоты <i>Крюкова М.В., Петровская Л.Е., Новотоцкая-Власова К.А., Крюкова Е.А., Ривкина Е.М., Долгих Д.А.</i> .....	109
Литические ферменты <i>Lysobacter</i> sp. XL1 <i>Кудрякова И.В., Тищенко С.В., Габдулхаков А.Г., Шишкова Н.А., Цфасман И.М., Васильева Н.В.</i> .....	109
Полифосфатазы дрожжей: свойства, функции, перспективы практического применения <i>Кулаковская Т.В., Андреева Н.А., Трилисенко Л.В., Рязанова Л.П., Думина М.В., Эльдаров М.А.</i> .....	110
Роль феноксидаз в различных аспектах жизнедеятельности микроорганизмов <i>Купряшина М.А., Ветчинкина Е.П., Никитина В.Е.</i> .....	111
РП сигнальные белки фотосинтезирующих микроорганизмов: от молекулярных механизмов до клеточных функций <i>Лапина Т.В., Минаева Е.С., Форчхаммер К., Ермилова Е.В.</i> .....	111
Анализ геномов штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> , несущих гены карбапенемазы NDM-1 <i>Лев А.И., Кисличкина А.А., Воложанцев Н.В., Асташкин Е.И., Еришова О.Н., Александрова И.А., Богун А.Г., Фурсова Н.К.</i> .....	112

Внесение мутаций в потенциальные сайты димеризации биназы <i>Лицевич И.М., Ульянова В.В.</i> .....	113
Влияние ингибитора протонной помпы карбонилцианид- <i>m</i> -хлорофенилгидразона (CCCP) на восстановление селенита бактерией <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 <i>Мамченкова П.В., Камнев А.А., Тугарова А.В.</i> .....	113
Компьютерная сборка метаболических путей <i>Минкевич И.Г.</i> .....	114
Выявление генных детерминант фотосистемы II у метанотрофных бактерий <i>Мирошников К.К., Дедыш С.Н.</i> .....	115
Микробиологическая и генетическая характеристика культур <i>Shigella flexneri</i> 1b, выделенных в Калининградской области <i>Мицевич И.П., Асташкин Е.И., Карцев Н.Н., Демушев К.В., Фурсова Н.К., Светоч Э.А., Дятлов И.А.</i> .....	115
Кадаверин как предиктор микроэкологических нарушений в вагинальном биотопе <i>Нестерова Л.Ю., Годовалов А.П., Карпунина Т.И.</i> .....	116
Биогенные полиамины принимают участие в регуляции Quorum sensing-зависимых процессов у бактерий <i>Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г.</i> .....	117
Одномоментные исследования носительства генов антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2015 и 2017 гг. <i>Новикова Т.С., Лев А.И., Асташкин Е.И., Ершова О.Н., Фурсова Н.К.</i> .....	118
Метаболический потенциал <i>Azospirillum thioophilum</i> BV-S <sup>T</sup> <i>Орлова М.В., Грабович М.Ю.</i> .....	118
Свойства лизилоксидазы <i>Haloterrigena turkmenica</i> <i>Пестов Н.Б., Калиновский Д.В., Ларионова Т.Д.</i> .....	119
История возникновения устойчивости бактерий к антибиотикам на основе анализа бактерий, выделенных из многолетнемерзлых отложений <i>Петрова М.А., Миндлин С.З.</i> .....	120
Известные и новые анаэробные пути, необходимые бактериям, когда ацетат является единственным источником углерода <i>Петушкова Е.П., Цыганков А.А.</i> .....	120
Современные представления о геноме клубеньковых бактерий <i>Румянцева М.Л., Мунтян В.С., Симаров Б.В.</i> .....	121
Построение математических моделей метаболических сетей с использованием графовой базы данных <i>Рясик А.А., Орлов М.А., Ермак Т.В., Сорокин А.А.</i> .....	122
Роль сопутствующего окислительного стресса в выживании клеток <i>Escherichia coli</i> , подвергнутых действию хлорида натрия <i>Секацкая П.А., Ахова А.В., Нестерова Л.Ю., Ткаченко А.Г.</i> .....	122
Стрессовый ответ фитопатогенной энтеробактерии <i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043 на дефицит азота <i>Сергеева Ю.П., Горшков В.Ю., Даминова А.Г., Гоголев Ю.В., Петрова О.Е.</i> .....	123
Генетические линии <i>Staphylococcus aureus</i> , ответственные за вспышки эксфолиативного дерматита, зарегистрированные в России с 2012 по 2016 гг. <i>Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Богун А.Г., Абаев И.В.</i> .....	124
Генетические детерминанты антибиотикорезистентности и вирулентности уропатогенных <i>Escherichia coli</i> , выделенных в Ярославле в 2016-2017 гг. <i>Слукин П.В., Ермоленко З.М., Асташкин Е.И., Фурсова Н.К., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Шепелин А.П.</i> .....	124

Термофильные СО-окисляющие прокариоты <i>Соколова Т.Г., Таранов Е.В., Провоторова Е.А., Черных Н.А., Лебединский А.В.</i> .....	125
Олигомерная организация рибонуклеазы <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Сокурченко Ю.В., Надырова А.И., Дудкина Е.В., Ульянова В.В.</i> .....	126
Сохранность ДНК в разновозрастных отложениях вечной мерзлоты <i>Спирина Е.В., Вишнинецкая Т.А., Ривкина Е.М.</i> .....	126
Систематика актинобактерий рода <i>Rathayibacter</i> в свете геномных данных <i>Стародумова И.П., Тарлачков С.В., Присяжная Н.В., Дорофеева Л.В., Арискина Е.В., Василенко О.В., Евтушенко Л.И.</i> .....	127
ITS2 – инструмент для разделения видов зеленых водорослей (Chlorophyta) <i>А.Д. Темралева, С.В. Москаленко</i> .....	128
Стимулирующий эффект никлозамида на биосинтез феназинов у бактерий рода <i>Pseudomonas</i> <i>Тетенева Н. А. Журина М. В., Мартыанов С. В., Плакунов В. К.</i> .....	129
Холестеринметаболизирующая активность <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Трапезников Я. П., Быкова Л.П., Годовалов А.П.</i> .....	129
Сравнительная геномика бактерий <i>Sphaerochaeta</i> <i>Трошина О.Ю., Ошуркова В., Щербакова В.А.</i> .....	130
Сравнительный анализ геномов группы « <i>Bacillus subtilis</i> », разделенных по способности секретировать гуанилпредпочитающие рибонуклеазы <i>Ульянова В.В., Шах Махмуд Р., Дудкина Е.В., Вершинина В.И., Ильинская О.Н.</i> .....	131
Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их свойства <i>Урядова Г.Т., Фокина Н.А., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В.</i> .....	131
Филогенетическое родство генов, ответственных за синтез липополисахарида и капсулы, в штаммах <i>Klebsiella pneumoniae</i> разных сиквенс-типов <i>Фурсова Н.К., Лев А.И., Шайхутдинова Р.З., Воложанцев Н.В.</i> .....	132
Интенсификация продукции секретируемых рибонуклеаз рода <i>Bacillus</i> в стрессовых условиях <i>Харитонова М.А., Бейсенова Ж.А., Колпаков А.И., Ульянова В.В.</i> .....	133
Разнообразие генов ключевых ферментов автотрофного метаболизма в осадках горячего источника Солнечный, кальдера Узон, Камчатка <i>Черных Н.А., Кубланов И.В., Лебединский А.В.</i> .....	133
Протеализиновый оперон <i>Serratia proteamaculans</i> кодирует новый ингибитор пептидаз семейства М4 <i>Чухонцева К.Н., Лемескина И.С., Сафина Д.Р., Демидюк И.В.</i> .....	134
Роль ДНК-связывающего PadR-подобного белка в образовании и поддержании покоящегося состояния микобактерий <i>Шлеева М.О., Трутнева К.А., Шумков М.С., Демина Г.Р., Капрельянц А.С.</i> .....	134
Разработка системы контроля антибиотикорезистентности в условиях сельскохозяйственного производства <i>Щепеткина С.В., Терлецкий В.П., Новикова О.Б.</i> .....	135
Белковые элиситоры болезнеустойчивости и антимикробные пептиды непатогенных для растений штаммов мицелиальных грибов: идентификация, механизм действия, роль в биоконтроле фиопатогенов <i>Щербакова Л.А., Одинцова Т.И., Стахеев А.А., Семина Ю.В.</i> .....	136
Характеристика параметров стресс-ответа микроорганизмов на действие 2,4,6-тринитротолуола <i>Яковлева Г.Ю., Горбунова А.С., Ильинская О.Н.</i> .....	137

Секция: Микробные технологии.....	138
Полифункциональные ферментные биопрепараты, действующие против бактериоза растений <i>Асланлы А.Г., Сенько О.В., Маслова О.В., Ефременко Е.Н.</i> .....	139
Энергосберегающая технология получения биоэтанола из ультрадисперсного растительного сырья <i>Атыкян Н.А., Ревин В.В.</i> .....	139
Выделение галотолерантных нефтеокисляющих бактерий – продуцентов биосурфактантов из прибрежного шельфа северной Кубы <i>Баутиста Х., Эрнандес-Гомес Т., Кардинале М., Колпаков А.И., Багаева Т.В.</i> .....	140
Эффективные микроорганизмы чернозема выщелоченного и перспективы их использования в сельском хозяйстве <i>Безлер Н.В., Сумская М.А., Петюренко М.Ю., Кислинская Е.Г.</i> .....	141
Особенности использования ризосферных бактерий для повышения эффективности микрклонального размножения растений <i>Бурыгин Г.Л.</i> .....	141
Перспективы интеграции микробных баз данных и каталогов микробных коллекций для развития биотехнологии <i>Василенко А.Н., Ступарь О.С., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Озерская С.М.</i> .....	142
Экологически безопасное производство наночастиц микроорганизмами <i>Воейкова Т.А., Журавлева О.А., Булушова Н.В., Вейко В.П., Исмагулова Т.Т., Лупанова А.Н., Шайтан К.В., Дебабов В.Г.</i> .....	143
Штамм <i>Streptomyces</i> sp. IB2016I91-2, выделенный из байкальского эндемичного моллюска <i>Benedictia baicalensis</i> – продуцент ангуциклинового антибиотика рабеломидина <i>Войцеховская И.В., Аксёнов-Грибанов Д.В., Протасов Е.С., Лужецкий А.Н., Тимофеев М.А.</i> .....	143
Сверхпродукция фермента ациламидазы в <i>Rhodococcus rhodochrous</i> связана с влиянием металлозависимых регуляторов экспрессии <i>Гречишников Е.Г., Шемякина А.О., Лавров К.В., Яненко А.С.</i> .....	144
Перспективы использования электрофизических методов для определения антибактериальной активности антибиотиков <i>Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Бородина И.А.</i> .....	145
Биосенсоры и биотопливные элементы. Исследования, ориентированные на практическое применение <i>Гуторов М.А., Решетилов А.Н.</i> .....	145
Новое поколение биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты <i>Дербигов Д.Д., Новиков А.Д., Синолицкий М.К., Яненко А.С.</i> .....	146
Биотрансформация модифицированных стеридов в перспективные прекурсоры <i>Довбня Д.В., Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.</i> .....	146
Создание штамма <i>Mycobacterium smegmatis</i> – продуцента ценных изопреноидов <i>Довбня Д.В., Брагин Е.Ю., Ивашина Т.В., Донова М.В.</i> .....	147
Очистка ПХБ-загрязненных почв с использованием аэробных бактерий-деструкторов <i>Егорова Д.О., Плотникова Е.Г.</i> .....	148
Биоремедиация почв, загрязненных органофосфонатами <i>Ермакова И.Т., Шушкова Т.В., Свиридов А.В., Винокурова Н.Г., Зеленкова Н.Ф., Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А.</i> .....	149
Отечественные диагностические латексные тест-системы: разработка и практическое использование <i>Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К.</i> .....	150

Деструкция пищевых азокрасителей лактобациллами с пробиотическим потенциалом <i>Есакова А.А., Тактарова Ю.В., Гладченко М.А., Чердынцева Т.А., Котова И.Б.</i> .....	150
Разработка экспресс–тестов для микробиологического анализа пищевых продуктов <i>Зайнуллина А.Р., Халиуллин Э.М., Яковлева Г.Ю.</i> .....	151
Электрогенный потенциал термофильных и алкалофильных микробных матов, выделенных из гидротерм и содово-соленых озер Бурятии <i>Зайцева С.В., Юрьев Д.А., Дагурова О.П., Жданова Г.О., Стом Д.И.</i> .....	152
Оптимизация условий культивирования для образования протеиназ – активаторов прекалликреина микромицетом <i>Aspergillus terreus</i> 2 <i>Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С.</i> .....	152
Получение биопрепарата комплексного действия <i>Ибрагимова С.А., Ревин В.В.</i> .....	153
Биоконверсия фитостерина в тестостерон рекомбинантными микобактериями <i>Карнов М.В., Стрижов Н.И., Суходольская Г.В., Николаева В.М., Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В.</i> .....	154
Деградация образцов бактериальной целлюлозы культурой, содержащей бактерии рода <i>Cellvibrio</i> и <i>Cytophaga</i> <i>Кленова Н.А., Маркова Ю.А., Ерофеева А.Е., Панкратов Т.А., Овчинникова Т.А.</i> .....	154
Биосинтез микофеноловой кислоты грибами рода <i>Penicillium</i> <i>Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.</i> .....	155
Роль <i>Humicola fuscoatra</i> ВНИИСС 016 в восстановлении микробного сообщества почвы в условиях гербицидной нагрузки <i>Колесникова М.В., Безлер Н.В.</i> .....	156
Регио- и стереоселективная оксифункционализация стероидов андростанового ряда микромицетами <i>Коллеров В.В., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В.</i> .....	157
Культивирование микромицета <i>Aspergillus ochraceus</i> ВКМ F-4104 в ферментационном комплексе для масштабирования получения активатора протеина С плазмы крови человека <i>Комаревцев С. К., Егорова М. А., Осмоловский А. А.</i> .....	157
Роль ризосферных бактерий в детоксикации комплексных загрязнений <i>Крючкова Е.В., Бурьгин Г.Л., Нешко А.А., Гринёв В.С., Щёголев С.Ю., Турковская О.В.</i> .....	158
Использование <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> 2AzMo для определения низших алифатических спиртов в водных растворах <i>Кувичкина Т.Н., Гридина В.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Решетилов А.Н.</i> .....	159
Микроскопические грибы – продуценты внеклеточных протеиназ для биотехнологии и медицины <i>Кураков А.В., Осмоловский А.А., Бобровская А.А., Покровская Ю.С., Дунаевский Я.Е.</i> .....	159
Получение гибридов типа «клетка в оболочке» на основе инкапсулированных в золь-гель матрицу дрожжей <i>Лаврова Д.Г., Каманина О.А., Понаморева О.Н.</i> .....	160
Биотехнология микробных экзополисахаридов <i>Лияськина Е. В., Ревин В. В., Богатырева А. О., Сапунова Н.Б., Парамонова Е. Н., Щанкин М. В.</i> .....	160
Микробные биопленки для продуктивного биокатализа и очистки окружающей среды <i>Максимова Ю.Г., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Демаков В.А.</i> .....	161

Антимикробные свойства штамма <i>Bacillus subtilis</i> 534– основы лекарственного препарата пробиотика СПОРОБАКТЕРИНА <i>Маланичева И.А., Кубанова М.Х., Алферова В.А., Коршун В.А., Драбкина И.В., Крупенио Т.В., Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И.</i> .....	162
Конвективный перенос углеводородокисляющих микроорганизмов-деструкторов в почве, загрязненной нефтепродуктами <i>Марченко А.И., Жариков Г.А.</i> .....	162
Повышение устойчивости дрожжей, различных экологических групп, к ультрафиолету с помощью сорбции гуминовых веществ на поверхности клеток <i>Мингтеева Д.Г., Тихонов В.В.</i> .....	162
Микробные процессы - анаммокс и метаногенез, в новых технологиях очистки сточных вод и переработки ТБО <i>Ножевникова А.Н., Литти Ю.А., Бочкова Е.А., Ковалев Д.А., Никитина А.А., Зубов М.Г.</i> .....	164
Хромогенная питательная среда Даг Урохром Агар для одноэтапного выделения и идентификации, клинически значимых условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) <i>Омарова С.М., Горелова В.Г., Юнусова Р.Ю., Ахмедова Р.С.</i> .....	164
Алкалофильные микроорганизмы для биологической очистки щелочных радиоактивных растворов <i>Осталкевич С.С., Колокольцев А., Сафонов А.В., Хижняк Т.В.</i> .....	165
Анаэробные целлюлозолитические микробные сообщества, разлагающие биомассу <i>Anabaena variabilis</i> <i>Петрова Е.В., Егорова М.А., Малахова Д.В., Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И.</i> .....	166
Влияние некоторых углеродных наноматериалов на свойства анода микробного топливного элемента <i>Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетилов А.Н.</i> .....	167
Создание прототипа технологии микробиологического синтеза такролимуса <i>Пошехонцева В.Ю., Фокина В.В., Салионов Д.С., Шутков А.А., Донова М.В.</i> .....	167
Нефтяные углеводороды-биомаркеры в продуктах термоллиза нерастворимой части биомассы архей <i>Thermaplasma</i> sp. <i>Пошибаева А.Р., Гируц М.В., Первалова А.А., Кошелев В.Н., Гордадзе Г.Н.</i> .....	168
Биоконверсия целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо <i>Прокудина Л.И., Егорова М.А., Малахова Д.В., Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И.</i> .....	169
Сравнительный анализ влияния синтетических и биологических поверхностно-активных веществ на биодеградацию н-гексадекана бактериями рода <i>Rhodococcus</i> <i>Пучкова М.Ю., Лыонг Т.М., Петриков К.В.</i> .....	170
Гидролитические ферменты экстремофильных микроорганизмов, выделенных из водных систем Байкальской рифтовой зоны <i>Раднагуруева А.А., Будагаева В.Г., Зайцева С.В., Бархутова Д.Д., Лаврентьева Е.В.</i> .....	170
Микробный биотопливный элемент и конвертерное накопление электрической энергии <i>Решетилов А.Н., Решетилова Т.А., Васильев Р.Г.</i> .....	171
Биогеохимические проницаемые барьеры для очистки водоносных горизонтов от компонентов радиоактивных отходов <i>Сафонов А.В., Андрющенко Н.Д., Бабич Т.Л., Захарова Е.В. Назина Т.Н.</i> .....	172
Деструктивные изменения в составе углеводородов нефти для характеристики нуклеации газогидратов <i>Сваровская Л.И., Манаков А.Ю., Алтунина Л.К., Стрелец Л.А.</i> .....	172
Иммобилизованные биокатализаторы в процессах метаногенеза: преимущества использования <i>Сенько О.В., Гладченко М.А., Слюсарев Д.А., Махлис Т.А., Ефременко Е.Н.</i> .....	173

Иммобилизованные биокатализаторы в процессах получения высокомолекулярных полисахаридов <i>Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.</i> .....	174
Антибактериальная активность нановолокон с иммобилизованным гентамицином против уропатогенных <i>Escherichia coli</i> <i>Слукин П.В., Ермоленко З.М., Фурсова Н.К., Игнатов С.Г.</i> .....	175
Создание биоконсерванта нового поколения на основе <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i> <i>Стоянова Л. Г., Сульtimiова Т.Д., Непрусов А.И.</i> .....	175
Микромицет <i>Aspergillus oryzae</i> как продуцент внеклеточных протеаз с активаторной активностью к белкам системы гемостаза <i>Тиморишина С.Н., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.</i> .....	176
«Косметика» для микроорганизмов: наномодифицированные микробные клетки в биотехнологии <i>Фахруллин Р.Ф.</i> ...../.....	177
«Клетки-киборги» для доставки нанотрубок галлуазита в организм нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>Фахруллина Г.И., Ахатова Ф.С., Гаязова Э.И., Фахруллин Р.Ф.</i> .....	177
Трансформация стероидных соединений умеренно термофильными актинобактериями <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> ВКМ Ас-666 <i>Фокина В.В., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В.</i> .....	178
Развитие и функционирование микроорганизмов в целостной системе переработки апатит-нефелиновых и медно-никелевых руд Мурманской области <i>Фокина Н.В., Яньшевская Е.С., Мязин В.А., Светлов А.В.</i> .....	179
Микробные технологии для очистки стоков от пиридинов <i>Хасаева Ф. М.</i> .....	179
Иммобилизация противоопухолевой рибонуклеазы биназы на нанотрубках галлуазита <i>Ходжаева В.С., Макеева А.Н., Ульянова В.В., Зеленихин П.В., Ильинская О.Н.</i> .....	180
Исследование биодеградации дегидроабиетиновой кислоты с использованием актинобактерий <i>Черемных К.М., Лучникова Н.А, Гришко В.В., Ившина И.Б.</i> .....	181
Утилизация соломы зерновых культур в полевых условиях с помощью аборигенного штамма <i>Humicola fuscoatra</i> ВНИИСС 016 <i>Черепухина И.В., Безлер Н.В.</i> .....	181
Экзогенная бактериальная рибонуклеаза оказывает противогриппозное действие при проникновении в клетки эукариот <i>Шах Махмуд Р., Ульянова В.В., Мустафа А., Ильинская О.Н.</i> .....	182
Особенности генетической организации локуса <i>LtbR</i> коринеформных штаммов и его модификации, приводящие к увеличению биосинтеза лизина <i>Шустикова Т.Е., Рябченко Л.Е., Яненко А.С.</i> .....	183
<b>Съезд Межрегионального Микробиологического Общества</b>	
Страницы истории Всесоюзного микробиологического общества <i>Колотилова Н.Н.</i> .....	184
Ближайшие и долгосрочные перспективы работы ММО <i>Бонч-Осмоловская Е.А.</i> .....	184



# Пленарные доклады

## Новые горизонты в исследованиях планктомицетов

Дедыш С.Н.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Москва, dedysh@mail.ru

*Planctomycetes* – это одна из широко распространенных, но бедно представленных охарактеризованными изолятами филогенетических групп домена Bacteria. Первый представитель планктомицетов - *Planctomyces bekefii* – был описан около столетия назад при микроскопическом анализе воды из пруда венгерским микробиологом Гимези, ошибочно принявшим его за планктонный гриб. Вопреки впечатляющему методическому арсеналу современной микробиологии, *P. bekefii* и другие виды этого рода до сих пор не получены в культурах и описаны только на основании морфологических критериев. Несмотря на изначальное описание в качестве водных бактерий, планктомицеты были впоследствии обнаружены с помощью молекулярных подходов в различных почвах, торфах, осадках, наскальных микробиоценозах и проч. Обычно они составляют от нескольких до полутора десятка процентов общего бактериального разнообразия этих экосистем. Несмотря на широкое распространение в природе, число полученных в культурах и детально охарактеризованных планктомицетов растет крайне медленно. На настоящий момент фила *Planctomycetes* включает класс *Planctomycetia*, порядки *Planctomycetales*, *Phycisphaerales* и “*Candidatus Brocadiales*”, которые насчитывают не более трех десятков родов. Наиболее изученными до последнего времени, как ни парадоксально, являлись представители “*Candidatus Brocadiales*”-планктомицеты группы анаммокс (анаммох), осуществляющие процесс анаэробного окисления аммония и применяющиеся в биотехнологиях очистки сточных вод. Знания же о «классических» планктомицетах порядка *Planctomycetales* и их функциях в природных экосистемах продолжают оставаться весьма скудными. Представители этого порядка поистине уникальны во многих отношениях – сложности организации клеток, жизненного цикла, состава липидов и проч. Осуществленный в последнее десятилетие анализ геномов ряда планктомицетов во многом способствовал углублению знаний о них, хотя доля генов, функции которых остаются неясны, в геномах этих бактерий составляет более половины. Большие размеры геномов (до 12 млн. п.о.) делают планктомицетов перспективными объектами для поиска новых биологически активных соединений. Лаборатория Микробиологии болотных экосистем Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН работает в области изучения планктомицетов с 2006 года. За это время сотрудниками лаборатории были описаны 8 новых родов и 10 видов, а также 2 новых семейства этих бактерий. Применение высокопроизводительного секвенирования позволило выявить и охарактеризовать чрезвычайно высокое разнообразие планктомицетов в бореальных болотах, переувлажненных почвах тундры, а также пресноводных водоемах. С помощью подходов метатранскриптомики был сделан ряд предположений о функциональном потенциале болотных планктомицетов, которые удалось подтвердить с помощью анализа геномов и изучения физиологии новых изолятов.

## Микробиотехнологии для стероидной фарминдустрии: новые биопроцессы, проблемы и перспективы

Донова М.В.

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

Лекарственные препараты на основе стероидных субстанций широко используются в медицине. Стероиды составляют значительный сектор мирового фармацевтического рынка. Микробная трансформация является эффективным способом получения высоковольтребованных стероидных активных фармацевтических субстанций (АФС) и ключевых интермедиатов из

возобновляемых природных источников. К настоящему времени разработан целый спектр эффективных биокаталитических методов, однако актуальными проблемами остаются поиск высокоэффективных природных штаммов и метаболическая инженерия путей микробного катаболизма стероидов с целью создания новых биопроцессов для получения биоактивных стероидных метаболитов. Изучение геномики, транскриптомики, применение биоинформатики, синтетической биологии обеспечивают инструментарий для понимания механизмов и регулирования метаболических путей стероидтрансформирующих микроорганизмов.

На основе геномного и транскриптомного профилирования установлены особенности организации генов стероидного катаболизма у ряда штаммов актинобактерий и выявлены ключевые гены, ответственные за ключевые этапы структурной модификации стероидов: окислительную деградацию боковой цепи стероидов, трансформацию 3 $\beta$ -ол-5-ен- в 3-кето-4-ен-структуры,  $\Delta^1$ -дегидрирование, 9 $\alpha$ -гидроксилирование, восстановление 17-кетогруппы. Сочетание каскада реакций деградативного пути с метаболическими блоками по отдельным этапам окисления стероидного ядра и гетерологической экспрессией эукариотических систем стероидогенеза обеспечивает возможность получения высоковольтребованных АФС и ключевых интермедиатов из фитостерина. На основе полученных высокопроизводительных рекомбинантных штаммов актинобактерий разработаны биопроцессы для получения из фитостероидов андростендиона и его структурных аналогов, тестостерона, дегидроэпиандростерона, прогестерона, а также новых изопреноидных метаболитов. Регио- и стереоспецифическое гидроксилирование полученных интермедиатов с применением высокоактивных штаммов мицелиальных грибов, а также применение химической дериватизации стероидных субстратов позволяет расширить спектр получаемых АФС и высоковольтребованных стероидных предшественников.

*Обсуждаются проблемы и перспективы промышленного применения биопроцессов в фармацевтической промышленности.*

## **Фармполлютанты как новая разновидность эмерджентных загрязнителей природной среды: поиск путей их детоксикации и биодegradации**

*Ившина И.Б.*

Пермский ФИЦ Уральского отделения РАН, ivshina@iegm.ru

Пермский государственный национальный исследовательский университет

Наиболее опасными среди эмерджентных загрязнителей являются фармацевтические поллютанты в виду высокой устойчивости их химической структуры и выраженной биологической активности. Озабоченность присутствием их в открытых экосистемах появилась сравнительно недавно. Если вопросы воздействия их на организм животных и человека интенсивно изучаются, появились первые работы по влиянию тотально применяемых антипиритических и анальгетических агентов на растения, то научные исследования в отношении микроорганизмов, которым при контакте с данными ксенобиотиками приходится решать проблему их детоксикации, только разворачиваются. Среди микроорганизмов, способных чутко реагировать на неблагоприятные изменения в среде обитания и инициировать адаптивные реакции, особое место занимают актинобактерии рода *Rhodococcus*. В связи с этим интерес представлял анализ возможного участия родококков экологически значимых видов в качестве ключевых биоокислителей фармполлютантов (ацетаминофена, ибупрофена, диклофенака, дротаверина, в частности), наиболее часто детектируемых в окружающей среде.

С целью понимания механизмов биодеструкции данных фармполлютантов расшифрованы полные геномы штаммов *R. erythropolis* ИЭГМ 267 и *R. ruber* ИЭГМ 231 – активных биодеструкторов широкого спектра сложных органических соединений. С помощью сравнительного биоинформационного анализа результатов секвенирования исследованы функциональные гены, контролирующие биодegradацию фармацевтических загрязнителей. Исследованы кинетика и закономерности процесса разложения фармполлютантов в зависимости от физиологического состояния (растущие, отмытые, иммобилизованные, покоящиеся бактериальные клетки) и условий культивирования (минеральный состав, уровень

активной кислотности ростовой среды, температурный режим ферментации, концентрации исходных экотоксикантов, приемы внесения их в среду культивирования) биодеструкторов.

Изучены механизмы регуляции (индукция, ингибирование) каталитической активности родококков в отношении фармполлютантов. Идентифицированы полученные метаболиты, характеризующиеся меньшими классами опасности, определены основные пути бактериального превращения исходных экотоксикантов. Исследованы специфические особенности взаимодействия родококков с фармполлютантами. Разработаны устойчивые полифункциональные биокаталитические системы на основе иммобилизованных родококков, обеспечивающие интенсификацию процессов биодеградации фармвеществ и их метаболитов.

*Исследования выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-44-590567) и Комплексной программы УрО РАН (проект № 15-12-4-10).*

## **Коллекции микроорганизмов: взгляд в будущее**

*Калакуцкий Л.В.*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушкино, klv@dol.ru

Существует мнение, что в будущем коллекции культур микроорганизмов (КК) перестанут существовать, а те основные функции, которые они выполняют, перейдут к соответствующим информационным базам данных (БД). Передача функций, однако, если и произойдет, то весьма нескоро. В ближайшие десятилетия КК и БД будут сосуществовать и активно взаимодействовать, совместно обеспечивая потребности и отражая уровень научно-технологического развития страны.

Ключевое слово «взаимодействие» относится и к двум важнейшим сферам деятельности КК: 1) формированию фонда с учетом эволюции знаний о мире микробов, реальных и потенциальных интересах пользователей; 2) рационализации коллекционного дела с учетом эволюции представлений в правовых, экономических и этических сферах.

Активный штурм «темной материи» в последние годы в значительной степени опирался на развитие «омик»-технологий и успехи в уточнении понятия «экониша» для вводимых в культуру микроорганизмов. Обсуждения итогов изучения почти каждого «микробиома» заканчивается, как правило, призывом поместить впервые открытые микроорганизмы в КК. Успехи в изучении симбиогенеза ставят вопрос о необходимости поддержания «нечистых» культур, а успехи в изучении прионов ставят вопрос о границах использования термина «генетические» ресурсы.

Сотрудники КК участвуют в увеличении фондов (более 50% новых таксонов бактерий описывается с их участием) – если это соответствует возможностям конкретных КК (БРЦ), которые определяются не только квалификацией сотрудников и технологическим оснащением. Поддержание фонда требует средств, а его расширение и обслуживание увеличивает расходы – что плохо согласуется с грантовой системой финансирования.

Серьезные вопросы требуют решения и в правовой сфере. В качестве примера можно указать вопрос о собственности. КК в РФ не являются юридическими лицами, и их структура, финансирование и характер действий в значительной степени определяются правилами и инструкциями, циркулирующими в цепочках «ведомство – базовая организация». Инструкции эти весьма разнообразны, но, как правило, обходят стороной вопрос о собственности (и согласование с Гражданским кодексом). Особое звучание проблема приобретает в связи с обсуждением присоединения России к «Нагойскому протоколу» к «Конвенции о биоразнообразии», определяющему механизмы и инфраструктуру по обеспечению легитимного оборота генетических ресурсов.

# Экосистемы Сибири – источник новых изолятов некультивируемых ранее Bacteria

*Карначук О.В.*

Томский государственный университет, Томск, olga.karnachuk@green.tsu.ru

Положение о том, что большинство бактерий и архей не поддается культивированию, – аксиома современной микробиологии. Хотя молекулярные подходы позволяют получить некоторую информацию независимо от культивирования, полное понимание физиологии и экологической роли невозможно без получения чистых культур. Использование новых подходов позволяет «приручить» некоторые формы, ранее считавшиеся некультивируемыми. На примерах местообитаний, связанных с добычей металлов и нефти в Сибири, мы продемонстрировали возможность выделения форм бактерий, ранее не поддающихся культивированию.

Ацидофильные Deltaproteobacteria были выделены из отходов добычи полиметаллов месторождения в Забайкальском крае путем создания градиента pH в биореакторе. Полученные ацидофильные, устойчивые к кобальту *Desulfovibrio* spp. могут быть использованы для получения наноструктурированных сульфидов кобальта.

Ранее не поддающиеся культивированию представители Firmicutes были выделены из глубинных водоносных горизонтов, вскрываемых нефтепоисковыми скважинами. Изучение физиологии нового организма не подтвердило выводы, сделанные ранее на основе геномных и метагеномных исследований.

## Функции и механизмы действия вторичных метаболитов цианобактерий

*Кокшарова О.А.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, oa-koksharova@rambler

К вторичным метаболитам бактерий относится широкий спектр веществ различной химической природы, обладающих разнообразными биологическими функциями. В настоящее время в микробиологии формируется новое направление – «химическая экология», предметом которой является изучение синтеза и функций этих метаболитов, а также клеточных ответов на их присутствие в окружающей среде. Среди молекул сигнальной природы особое внимание привлекают вторичные метаболиты древнейших фотоавтотрофных микроорганизмов – цианобактерий. Эти молекулы относятся к различным химическим классам, таким как нерибосомные пептиды, небелковые аминокислоты, алкалоиды, терпеноиды и многие другие. Вторичные метаболиты играют роль в жизни как самих продуцентов, так и организмов, на которые направлено их действие. Однако, молекулярные аспекты этого действия недостаточно исследованы. Метаболиты могут выступать в виде аллелопатических химических веществ, участвовать в передаче сигналов, в ответе на стресс. Среди вторичных метаболитов особое место занимают небелковые аминокислоты. Они могут встречаться как в свободном состоянии, так могут входить в состав циклических пептидов, таких как микроцистины и нодулярины, представляющие собой опасные цианотоксины. Однако, функции этих молекул в метаболизме самих цианобактерий и их симбионтов пока недостаточно изучены. Среди гипотез выдвигаются следующие: эти молекулы 1) являются сигнальными, вовлеченными в регуляцию экспрессии генов в бактериальной популяции; 2) служат для борьбы с конкурентами и врагами; 3) участвуют в контроле численности собственной бактериальной популяции в меняющихся окружающих условиях; 4) могут быть хелаторными агентами, позволяющими бактериям связывать ионы металлов. Известно, что продуцируемая цианобактериями небелковая нейротоксичная аминокислота бета-N-метиламин-L-аланин (ВМАА) оказывает разнообразное действие на фитопланктон, растения и животных. Аккумуляция этого цианотоксина в природе в пищевых цепях вызывает опасения. Неизвестна роль этой небелковой аминокислоты в клетках самих цианобактерий. Мы исследуем механизмы воздействия ВМАА на клетки

дiazотрофных нитчатых цианобактерий с использованием различных экспериментальных методов и подходов: микробиологических, молекулярно-генетических, транскриптомных, протеомных, биоинформационных.

*Работа поддержана грантами РФФИ №№ 14-04-00656 и 17-04-00412.*

## **Метагеномика и геномика единичных клеток для микробиологии**

*Марданов А.В., Кадников В.В., Равин Н.В.*

Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, mardanov@biengi.ac.ru

Микробиология XX века была построена на исследовании чистых культур, что дало представление о разнообразии метаболических путей микроорганизмов, осуществляемых ими биохимических процессах, и их роли в биосфере. С развитием молекулярных методов исследования микроорганизмов стало очевидно, что более 99% микроорганизмов из природных экосистем невозможно культивировать в лабораторных условиях. Так, из примерно 100 известных филумов прокариот около половины не имеют культивируемых представителей. Геномный анализ является основным инструментом для изучения «некультивируемых» микроорганизмов. Первый подход, метагеномика, основан на расшифровке и анализе метагенома микробного сообщества. Анализ метагеномных данных с помощью биоинформатики позволяет не только охарактеризовать состав и генетический потенциал сообщества, но и выделить из метагенома геномы отдельных видов микроорганизмов, в том числе и «некультивируемых». Второй подход – выделение из природного микробного сообщества единичных клеток и расшифровка их индивидуальных геномов.

С помощью методов метагеномики мы исследовали микробные сообщества экстремальных экосистем. Объектами исследований были микробные сообщества глубоководных подземных вод Западной Сибири. Эти экологические ниши характеризуются анаэробными условиями, высоким давлением и повышенной температурой. Анализ метагеномов этих микробных сообществ показал, что во многих случаях среди обнаруженных микроорганизмов менее половины относились к известным видам, а остальные представляли «некультивируемые» группы, часть из них были ранее не известны даже по последовательностям генов 16S рРНК. Анализ метагеномов позволил собрать 30 полных или почти полных геномов микроорганизмов, среди которых были представители кандидатных филумов *Aminicenantes*, *Armatimonadetes*, и BRC1, а также полный геном представителя нового обнаруженного нами «некультивируемого» филума BY1. В результате секвенирования геномов единичных клеток из микробных сообществ подземных термальных вод и донных осадков озера Байкал получены геномы бактерий, представляющих филумы *Aerophobetes*, *Aminicenantes*, *Atribacteria*, *Caldiserica*, *Parcubacteria*, *Gottesmanbacteria*, *Latescibacteria*, *Microgenometes* и NC10.

*Работа поддержана грантом РФФИ 14-14-01016.*

## **Вид у прокариотов: общая проблематика и история с цианобактериями**

*Пиневиц А.В.*

Санкт-Петербургский государственный университет, С.-Петербург, Pinevich.A@mail.ru

Линнеев вид (*линнеон*) – это популяционная система, элементы-особи которой взаимно сходны по фенотипу и генотипу; как правило, они скрещиваются только друг с другом, т.е. изолированы репродуктивно, и существуют в ограниченном ареале, т.е. изолированы географически и экологически. Легко заметить, что в данном случае ведущим критерием базового таксона служит “внешнее” *различие*, а “внутреннее” сходство рассматривается как морфологическая очевидность. Прокариоты же, как известно: а) лишены полового процесса, хотя широко используют механизмы латерального генетического переноса, в том числе между доменами, т.е. обладают потенциальным промискуитетом; б) потенциальные космополиты (everything is everywhere); в) потенциально способны к экологической адаптации во всем диапазоне существования органической жизни. Очевидно, что в данном случае ведущим

критерием базового таксона служит не “внешнее” различие, а “внутреннее” *сходство*. С учетом концептуального отличия от линнеева вида (*species*; *sp.*) эквивалентный таксон у прокариотов может обозначаться как *симилон* (*similon*; *sp.*, сокр. *similon proprius* – специфический симилон). Поэтому взамен тщетных попыток адаптировать линнеон к прокариотам следует сосредоточиться на гено- и фенотипических критериях симилона, хотя пока эта задача решается только путем консенсуса. В частности, филогенетическим критерием принадлежности к одному виду или эквивалентной виду рабочей таксономической единице (ОТЕ) служит, для культивируемых штаммов,  $\geq 70\%$ -ное гибридное сходство ДНК и  $\leq 5^\circ\text{C}$   $\Delta T_m$  (Wayne et al., 1987). Третий критерий, который применяется и к виртуальным видам (филотипам) – это сходство последовательности 16S рРНК (на текущий момент, 98,65%; Kim et al., 2014). Надежность этих критериев ставит под сомнение гетерохрония эволюции геномов, а также незакономерный характер их паралогических и/или ортологических перестроек. Критерии фенотипического сходства в целом проблематичны и во многих случаях выбраны субъективно: древо ssuРНК парадоксально (фенотипы родственных объектов контрастны, и наоборот); природные признаки, оцениваемые как значимые, имеют тенденцию изменяться и/или исчезать при культивировании. Вопиющим примером неудачного применения т.н. полифазной таксономии, т.е. совместного учета как можно большего числа гено- и фенотипических критериев (Vandamme et al., 1996) служат цианобактерии: универсальный тип метаболизма не оставляет иного выхода, как апеллировать к второстепенным и/или эфемерным морфологическим признакам. Более того, из-за двусмысленности своего статуса эти бактерии находятся вне ICNP, и номенклатура подавляющего большинства представителей беспрецедентно упрощена (*Родовое имя* *sp.* индекс штамма). Таким образом, принципиальное различие линнеева вида и ОТЕ прокариотов требует не столько (и не только) разных названий для этих фундаментальных таксонов. Очевидно, необходим новый системный подход к оценке “внутреннего” сходства, чтобы, с одной стороны, рационально ограничить спектр фенотипических критериев, с другой стороны – найти и использовать дополнительные филогенетические критерии (например, профиль рибосомных белков, анализируемых методом MALDI-TOF MS). Бесспорно, система прокариотов специфична, и ее описание требует иных подходов и методов, чем, например, для растений и животных.

## **Обмен сигналами между растениями и микроорганизмами, обеспечивающий высокоспецифичный симбиоз**

*Тихонович И.А.*

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», СПб, Пушкин, ARRIAM2008@yandex.ru

ФГБУ высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, Санкт-Петербург, i.tikhonovich@spbu.ru

Формирование микробиома растений требует адекватной оценки окружающей среды, прежде всего с точки зрения разграничения микроорганизмов по их возможному влиянию на рост и развитие растений. В последнее время достигнуты значительные успехи в понимании молекулярно-генетических механизмов, лежащих в основе взаимного узнавания хозяев и микросимбионтов самой различной природы, выявлено их сходство с процессами иммунизации растений.

Важнейшими компонентами сигнального пути являются рецепторы растений, воспринимающие бактериальные сигналы, в частности LysM-рецепторы. Удобным подходом для выяснения их функции может быть компьютерное моделирование связывания этих белков с возможным лигандом (докинг). Наиболее энергетически предпочтительные модели указывали на возможность укладывания остова Nod-фактора в желобки на поверхности белковых глобул рецепторов, что подтверждает их роль в узнавании партнеров. Связывание Nod-фактора с рецепторным комплексом запускает сигнальный каскад, приводящий к активации экспрессии симбиоз-специфичных генов. Анализ симбиотических мутантов бобовых растений выявил общий набор генов, необходимых не только для развития бобово-ризобияльного симбиоза, но и для установления симбиоза бобовых растений с арбускулярными грибами (арбускулярной микоризы). При этом для связывания сигнальных молекул микоризных грибов Muc-фактора

необходим отдельный рецептор, тогда как дальнейшие компоненты сигнального пути, являются общими для бобово-ризобиального симбиоза и арбускулярной микоризы.

На основе анализа различных мутантов растений по генам рецепторного комплекса выявлены новые компоненты сигнального пути и охарактеризована их способность к связыванию бактериальных сигналов. Эти сигналы оказываются достаточно сходными для симбиотических бактерий, грибов, фитопатогенов, что делает актуальным исследование способов специфического узнавания сходных эффекторов близкими по структуре рецепторами, а также путей, по которым растительная клетка дифференцирует множество сигналов, получаемых из ризосферы. Знание этих механизмов является необходимым для разработки путей совершенствования существующих и создания новых симбиозов.

*Работа поддержана грантом РФФ №16-16-10043.*

## **Омикс-технологии и определение бактериального резистома: молекулярные основы адаптации к антимикробным препаратам у молликут**

*Чернов<sup>1,2</sup> В.М., Медведева<sup>1,2</sup> Е. С., Музыкантов<sup>1,2</sup> А.А., Баранова<sup>1,2</sup> Н.Б., Малыгина<sup>1</sup> Т.Ю.,  
Синягина<sup>2</sup> М. Н., Булыгина<sup>2</sup> Е.А., Чернова<sup>1,2</sup> О.А.*

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань,  
chernov@kibb.knc.ru

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Молликуты (класс Mollicutes), мельчайшие из способных к самостоятельной репликации бактерий, быстро адаптируются к неблагоприятным условиям среды и развивают устойчивость к антимикробным препаратам. Решение проблемы контроля контаминаций клеточных культур и инфекций, вызываемых представителями класса Mollicutes, связывают с исследованиями механизмов, определяющих оперативную адаптацию этих микроорганизмов к стрессорам. Нами впервые был выявлен везикулярный трафик у представителей класса Mollicutes, опосредующий у бактерий секрецию широкого спектра соединений, включая белки, ДНК и РНК, и показано участие внеклеточных везикул в развитии устойчивости молликут к антимикробным препаратам. Появление омикс-технологий определило новые возможности для выявления молекулярных основ адаптации бактерий к стрессорам и определения резистомов – совокупности всех генов и их продуктов, которые принимают участие в формировании резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Данные, полученные нами в результате применения методов полногеномного секвенирования и протеомного профилирования, указывают на то, что устойчивость к антимикробным препаратам у представителей класса Mollicutes может обеспечиваться более сложными механизмами, чем предполагалось ранее. Множественные мутации в геноме, в том числе влияющие на эпигенетическую регуляцию, вирулентность и стресс-реактивность, и горизонтальный перенос детерминант устойчивости к антибиотикам посредством внеклеточных везикул могут определять глобальное репрограммирование многих клеточных процессов, обеспечивающее резистентность молликут к антимикробным препаратам и выживание в неблагоприятных условиях среды. Полученные нами данные определяют необходимость изменения подходов к разработке системы контроля контаминаций клеточных культур и инфекций, вызываемых представителями класса Mollicutes.

*Исследования поддержаны грантами РФФИ 15-44-02594, 16-34-00660 и Президента РФ МК-1099.2017.4*

# Секция: Микробное разнообразие микроорганизмов

## Длинноволновые хлорофиллы цианобактерий

Аверина С.Г., Сенатская Е.В., Пиневиц А.В.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, s.averina@spbu.ru

Свет видимой части спектра активно поглощается фотосинтетическими пигментами цианобактерий, осуществляющих кислородный фотосинтез. Использование дальнего красного света (>700 нм) традиционно считалось свойством анаэробных фототрофных бактерий, обладающих бактериохлорофиллами.

Начиная с 1996 г. обнаруживаются цианобактерии, содержащие в клетках особые формы хлорофиллов: хлд и хлф. Эти пигменты отличаются от хл а присутствием формильной группы в кольце 1 (в положениях С3 и С2, соответственно), что приводит к смещению их красного максимума поглощения в более длинноволновую область. В результате, хлд- и хлф-содержащие цианобактерии могут осуществлять кислородный фотосинтез с использованием дальнего красного света.

По характеру синтеза длинноволновых хлорофиллов выделяют две группы цианобактерий: а) хроококковые цианобактерии р. *Acaryochloris*, конститутивно синтезирующие хлд как основной пигмент независимо от условий освещения; б) цианобактерии различных систематических групп (10 культивируемых штаммов), адаптивно синтезирующие хлд и/или хлф в условиях освещения дальним красным светом.

Нами исследованы хлд- и хлф-содержащие штаммы в коллекции CALU СПбГУ, а также в накопительных культурах из природного материала. С этой целью мы проводили культивирование при освещении дальним красным светом (LED-лампы с максимумом излучения 730 нм), анализировали *in vivo* спектры культур на предмет присутствия поглощения в области 700 нм и выше и идентифицировали пигменты в соответствии со спектрами поглощения HPLC-фракций.

Согласно полученным данным, только два из 40 проанализированных штаммов – *Chlorogloeopsis fritshii* CALU 759 и *Synechocystis* sp. CALU 1173 – могут синтезировать хлф. Новый штамм *Chlorogloeopsis* sp. с повышенным *in vivo* поглощением в длинноволновой области спектра выделен из накопительных культур микробного мата оз. Камерон (Восточная Антарктида), проводится идентификация его пигментов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 16-04-00174а с использованием оборудования ресурсных центров «МиК», «Культивирование микроорганизмов» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества» Научного парка СПбГУ.

## Метаболический коэффициент и содержание микробной биомассы в разновозрастных почвах хроносерии подзолов, формирующихся на отвалах карьера по добыче водноледниковых песков Ленинградской области

Алексеев И.И.<sup>1</sup>, Дмитракова Я.А.<sup>1</sup>, Абакумов Е.В.<sup>1</sup>, Иванова Е.А.<sup>1,2,3</sup>, Першина Е.В.<sup>1,2</sup>,  
Кимеклис А.К.<sup>1,2</sup>, Зверев А.О.<sup>1,2</sup>, Поляков В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФГБНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, e\_abakumov@mail.ru

Хроносерии почв, формирующихся на разнообразных субстратах, представляют особый интерес для почвенно-биологических и микробиологических исследований. Разновозрастные почвы являются своеобразной моделью инициального педогенеза и онтогенеза почв. В связи с этим были изучены микробиологические параметры развития почв на разных сроках восстановления лесной растительности на отвалах карьера по добыче водноледниковых отложений в Ленинградской области (близ поселка Малукса). Изученные почвы представлены



следующей хроносерией: песчаная порода без видимых педогенных изменений («нулевая стадия»), псаммозем серогумусовый (10-15 лет), эмбриоподзол (25-30 лет), подзол (70 лет) и подзол фоновый (климаксная экосистема). Изучали величины базального и субстрат-индуцированного дыхания почв, содержание микробной биомассы и метаболический коэффициент.

Установлено, что абсолютная величина базального и субстрат-индуцированного дыхания почв максимальна на наиболее активной стадии преобразования минерального субстрата – эмбриоподзол (25-30 лет), после чего она снижается в 70-летнем и фоновом подзолах. При этом общее содержание микробной биомассы максимально в эмбриоподзоле и в 70-летнем подзоле. Величины метаболического коэффициента уменьшаются вниз по профилю изученных почв, что свидетельствует о стабилизации процессов трансформации органического вещества с глубиной. При этом уровни метаболического коэффициента снижаются в большинстве почвенных горизонтов с возрастом почв, что свидетельствует о стабилизации процесса минерализации органического вещества.

Таким образом, наиболее активная стадия почвообразования связана с образованием лесной экосистемы с высоким проективным покрытием и формирующейся подстилкой, что приводит к инициации подзолистого процесса. На этой же стадии происходит наиболее активная трансформация органического вещества в почвах.

*Работа выполнена при поддержке РНФ, грант № 17-16-01030.*

## **Эволюция почвенного микробиома, контролируемая растением**

*Андронов Е.Е., Иголкина А.А., Кимеклис А.К., Чирак Е.Р., Копать В.В., Проворов Н.А.*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, [arriam2008@yandex.ru](mailto:arriam2008@yandex.ru)

Растение является одним из наиболее мощных факторов, формирующих почвенный микробиом. Действия растения, как организатора почвенного микробиома, многообразны и представлены широким спектром эффектов, начиная от формирования специфического ризосферного микробиома и заканчивая глубокими эволюционными преобразованиями почвенного микробиома на геномном, геномном и метагеномном уровне. Несомненно, что наиболее яркие примеры таких преобразований мы можем видеть в эволюции глубоко интегрированных растительно-микробных систем, таких, как бобово-ризобияльный симбиоз. В настоящем сообщении будут суммированы результаты нескольких исследований, демонстрирующих роль растения в эволюции ризобияльных генов, геномов и метагеномов. Объектами данных исследований являлись симбиотические системы, сформированные ризобиями и их растениями-хозяевами, как широко распространенными, так и их реликтовыми сородичами, такими как *Vavilovia formosa*, являющейся, по всей видимости, ближайшим живым родственником последнего общего предка всей трибы *Fabeae*. Исследование геномного, геномного и метагеномного разнообразия ризобий-микросимбионтов этих растений с использованием высокопроизводительного секвенирования, эволюционной и популяционной статистики, а также молекулярного моделирования позволило выявить несколько феноменов, раскрывающих роль растения как мощного «драйвера» эволюции ризобий. Один из этих феноменов назван нами «эволюционным прессформингом», эффект которого состоит в том, что результатом коэволюции популяций бобового растения и его ризобияльных микросимбионтов является «запрессовывание» генетического разнообразия популяции ризобий по гену *nodA*, кодирующего один из этапов синтеза сигнальной молекулы Nod-фактора, в «матрицу», сформированную генетическим разнообразием растительной популяции по гену *NFR5*, кодирующему растительный рецептор Nod-фактора. Другой феномен описывает влияние растения на геномную эволюцию ризобий. Анализ геномов ризобияльных микросимбионтов эволюционного реликта вавилонии показал, что они, также как и растение-хозяин, имеют целый ряд черт организации генома, которые могут быть атрибутированы как реликтовые. Это обстоятельство не только предоставляет неожиданную поддержку статуса вавилонии как эволюционного реликта, но и позволяет сформулировать небольшое и очень специфическое расширение для теории центров происхождения культурных растений Н.И. Вавилова, описывающее разнообразие ризобий в обычных и реликтовых видах бобовых. Действительно,

если, образно говоря, рассматривать эволюцию ризобий как их «одомашнивание» растением, то мы вполне можем ожидать присутствия некоторого разнообразия ранних эволюционных вариантов ризобий у эволюционных реликтов бобовых, что именно мы и видим в случае вавилови.

*Работа поддержана грантом РФФ 14-26-00094П*

## **Углеводный состав микробных матов гидротерм Байкальской рифтовой зоны**

*Бархутова Д.Д.<sup>1</sup>, Будагаева В.Г.<sup>1</sup>, Раднагуруева А.А.<sup>1</sup>, Лаврентьева Е.В.<sup>1,2</sup>,  
Дмитриева О.М.<sup>2</sup>, Оленников Д.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН,  
Улан-Удэ, darima\_bar@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

Прокариотные организмы синтезируют широкий спектр многофункциональных полисахаридов. Экзо- и эндополисахариды прокариот обладают металл-хелатирующей, противовоспалительной, противовирусной, противоопухолевой и другими видами биологической активности. Наши исследования показали, что микробные сообщества гидротерм Байкальской рифтовой зоны (БРЗ) являются высокопродуктивными экосистемами и более половины органического вещества микробных сообществ приходится на углеводы. В этой связи гидротермы Бурятии могли бы служить источником получения биологически активных полисахаридов. Образцы микробных матов были собраны в 2013–2015 гг. в гидротермах БРЗ: Алла, Кучигер, Сеюя, Гарга. Для изученных микробных матов характерно присутствие различных углеводных групп, в том числе маннита, нейтральных и кислых моносахаридов. Наибольшая концентрация маннита обнаружена в верхних слоях (5.41–7.25 мг/г), наименьшая – в нижних слоях (2.59–3.40 мг/г) матов. Напротив, максимальная концентрация уроновых кислот в биомассе матов (2.08–15.85 мг/г) была выявлена в нижних слоях. В составе нейтральных моносахаридов преобладали к галактоза, глюкоза, фукоза, манноза и ксилоза, в следовых количествах присутствовали арабиноза и рамноза.

Выявленные особенности накопления отдельных углеводных компонентов, возможно, являются следствием таксономического разнообразия прокариот, образующих микробный мат, и зависят от физико-химических условия их обитания. Анализ филогенетического разнообразия микробного сообщества гидротерм с помощью секвенирования гена 16S rRNA показал, что 50-70 % сообщества составляли представители филы Proteobacteria. Далее по распространенности были бактерии филумов Cyanobacteria, Acidobacteria и Firmicutes. Микроорганизмы данных групп известны как производители различных полисахаридов, в частности как потенциальные продуценты экзополисахаридов с новыми и необычными характеристиками и функциональной активностью в экстремальных условиях.

Впервые из микробного маты гидротермы Сеюя (48°C, pH 9,5) получена водорастворимая фракция полисахаридов, охарактеризованная как гетерополисахарид с высоким содержанием галактозы, глюкозы, маннозы и уроновых кислот. Его растворы обладали способностью к связыванию ионов Fe<sup>2+</sup>, а также мембраностабилизирующим, антиатерогенным и противовоспалительным действием, сравнимым с активностью альгиновой кислоты.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 15-44-04335 и 15-04-01275.*

## **Подледные микробные сообщества озера Байкал**

*Башенхаева М.В., Захарова Ю.Р., Петрова Д.П., Галачьянц Ю.П., Ханаев И.В.,  
Сакирко М.В., Лихошвай Е.В.*

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

В водных экосистемах в подледный период на границе раздела фаз «вода-лед» происходит формирование сообществ микроорганизмов, состоящих из микроводорослей, простейших и бактерий. Условия подо льдом значительно отличаются от условий периода

открытой воды. Уникальность этой экологической ниши определяется сочетанием нескольких факторов: толщиной льда и снежного покрова, интенсивностью солнечной радиации, концентрацией биогенных элементов, температурой. Озеро Байкал – ежегодно полностью покрывается льдом. Подледное цветение – один из наиболее значимых периодов развития фитопланктона, определяющего основу первичной продукции озера. Развитие микроводорослей тесно связано с деятельностью гетеротрофных бактерий, которые являются важным компонентом в планктонных микробных трофических сетях. Целью работы было изучить биоразнообразие и таксономическую структуру подледных микробных сообществ озера Байкал с помощью пиросеквенирования фрагментов гена 16S рРНК. Пробы воды, прилегающей к нижней поверхности льда, были отобраны водолазами с конца февраля (начало марта) по начало апреля с интервалом в две недели на протяжении трех лет на четырех станциях на разном расстоянии от берега. Для сравнения были взяты пробы воды с водной толщи. Всего было отобрано 33 пробы. Физико-химические параметры, видовой состав и количественные показатели микроводорослей, а также общая численность бактерий были определены общепринятыми методами. Пиросеквенирование осуществляли на платформе GS FLX 454 Roche. Анализ данных проводили при помощи программного пакета Mothur, полученные последовательности классифицировали на основе базы данных Silva123.

В результате было проанализировано 244 886 последовательностей, которые были отнесены к 27 филумам, 238 семействам и 317 родам. Всего было выявлено 8 487 OTUs с генетической дистанцией 0.03. Таксономический состав бактериальных сообществ изменялся как на протяжении одного сезона отбора проб, так и по годам. В 2011 г. в бактериальном составе доминировали *Verrucomicrobia* (род *Luteolibacter*), *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria*. В 2013 г. наибольшие доли принадлежали к филумам *Bacteroidetes* (род *Flavobacterium*), *Verrucomicrobia* (*Candidatus Methylocandidatus Methylobacterium*) и *Cyanobacteria*. В 2015 г. доминировали *Betaproteobacteria* и *Bacteroidetes* (род *Flavobacterium*). Кроме того, подо льдом развивались разные микроводоросли: диатомеи, динофлагелляты и зеленые. Изменения в таксономическом составе сообществ происходили в зависимости от удаленности от берега. Сообщества пелагической зоны (конца марта–начала апреля) отличались по соотношению доминирующих таксонов от сообществ литорали и были сходны с водной толщей. Подледные сообщества литоральной зоны значительно отличались по таксономическому составу от сообществ из водной толщи. На разделе фаз доминировали представители рода *Flavobacterium*, а в водной толще наиболее многочисленными были представители *Actinobacteria* (род *Planctomycetia*), а также *Betaproteobacteria* (род *Massilia*). Показано, что таксономическая структура подледных микробных сообществ озера Байкал изменяется в течение одного сезона, различается по годам, варьирует в зависимости от пространственного распределения и может зависеть от состава развивающихся подо льдом микроводорослей.

*Работа выполнена в рамках проекта ФАНО № 0345–2016–0005.*

## **Деструктивная активность аспергиллов, выделенных из различных экологических ниш**

*Баязитова А.А.<sup>1</sup>, Надеева Г.В.<sup>2</sup>, Яковлева Г.Ю.<sup>2</sup>, Ильинская О.Н.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Казань,  
alien2110@gmail.com

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Сегодня все большее значение для здоровья человека приобретают потенциально патогенные грибы, широко распространенные в окружающей среде, и в то же время способные вызывать грибковые заболевания. Считавшиеся ранее редкими возбудителями инфекционных заболеваний, грибы рода *Aspergillus* являются причиной возникновения различных микозов (аспергиллезов), а также причиной отягощения основного заболевания и смертности у больных с иммунодефицитами. Нами выделены 3 серии штаммов *Aspergillus niger* из различных источников: природные штаммы с внутренних стен старых жилых помещений центрального района г. Казани, с поврежденных старинных арабографических рукописей фонда Научной библиотеки Казанского федерального университета, и клинические изоляты от больных отомикозами и дерматитами. В настоящей работе проведена сравнительная оценка уровня

ферментативной активности (липолитической, амилолитической и кератиназной, важных для повреждения тканей и волос человека) у клинических и природных штаммов *A. niger*. Видовая принадлежность штаммов определена по морфологическим признакам и подтверждена геномным анализом по сиквенсу ампликонов 18S рРНК после соответствующей изоляции ДНК микромицет.

Все штаммы *A. niger*, выращенные при 30°C, проявляли липолитическую активность в тесте на гидролиз эфиров жирных кислот. Выделенные из жилых помещений штаммы демонстрировали более высокий уровень липолитической активности по сравнению с клиническими штаммами, повышение температуры до 37°C оказывало ингибирующее действие на липолитическую активность. Наиболее высокие значения амилолитической активности также были получены для природных изолятов. Кератиназная активность, определенная микроскопически по деструкции волос, у исследованных штаммов не отличалась. В то же время методами флуоресцентного анализа было выявлено, что ряд клинических штаммов образует вокруг оси волоса плотный чехол, вследствие чего морфологические параметры деструкции не визуализировались. Группа аспергиллов, выделенных с арабографических рукописей, обладала низким уровнем исследованных ферментов. Однако для этой группы был установлен вклад в изменение качественных характеристик европейской и азиатской бумаг – носителей каллиграфии, подтвержденных данными сканирующей электронной микроскопии с использованием низковакуумного метода и элементного анализа образцов поврежденной микромицетами бумаги. Вариабельность ферментативной активности внутри исследованных групп, демонстрирующих наличие штаммовых различий аспергиллов, позволяет заключить, что оценка ферментативной активности может быть предпосылкой для разработки критерия оценки вирулентности *A. niger*. Высокий уровень активности тканеповреждающих ферментов у природных изолятов из жилых помещений может опосредовать вклад в известный «синдром больных зданий» (sick building syndrome), а выявленные нами изменения элементных характеристик носителей каллиграфии вследствие деятельности микромицет позволяют разработать уникальную базу данных для типологии поврежденных арабографических рукописей.

## **Структура и активность метанового фильтра лесотундры Ямала и факторы его дестабилизации**

*Белова С.Э.<sup>1</sup>, Данилова О.В.<sup>1</sup>, Гагаринова И.В.<sup>2</sup>, Дедыш С.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный Исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, svet-bel@mail.ru

<sup>2</sup>ГКУ ЯНАО «Научный центр изучения Арктики», Надым

Арктические наземные экосистемы являются крупнейшим депозитарием органического углерода, потеря стабильности которого становится все более реальной в свете происходящих климатических изменений. Даже незначительное потепление может привести к вовлечению существенной части захороненной в Арктике органики в цикл углерода, что сделает эти экосистемы крупнейшим источником парникового газа метана (CH<sub>4</sub>). В какой степени потоки CH<sub>4</sub> могут быть компенсированы активностью естественного микробного фильтра и какова стабильность последнего в условиях изменяющегося климата, пока остается неизученным.

Настоящие исследования были проведены в районе г. Надым в период 2014 - 2016 г.г. совместно со специалистами Научного центра изучения Арктики. С помощью метода статических камер были измерены потоки CH<sub>4</sub> из ряда экосистем района полевых исследований. Почвы сосновых редколесий лесотундры с лишайниковым покровом функционировали в качестве стока атмосферного CH<sub>4</sub>. Величины окисления атмосферного метана этими почвами лежали в диапазоне 0.4-0.6 мг C-CH<sub>4</sub> м<sup>-2</sup> в день. Активность окисления метана была локализована в очень узком (2-4 см) поверхностном слое почвы, расположенном непосредственно под лишайниками и богатом органическим веществом.

Для идентификации микроорганизмов, слагающих метанооксиляющий фильтр тундровых экосистем, был применен анализ фрагментов гена *pmoA*, кодирующего мембранную метанмонооксигеназу. Отличительной особенностью сообщества метанотрофных бактерий в почвах под лишайниками явилось присутствие представителей некультивируемой группы

USC $\alpha$  (Upland Soil Cluster alpha), которая типична для кислых автоморфных почв, функционирующих в качестве стока атмосферного метана.

Как показали полевые исследования, тонкий метанооксиляющий фильтр этих экосистем в высокой степени подвержен воздействиям различного характера, как природного, так и антропогенного. Значительная «ёмкость» метанооксиляющего фильтра этих почв, зарегистрированная в 2014 году, была редуцирована практически до нулевых значений летом аномально жаркого 2016 года. Другим возможным фактором дестабилизации нормального функционирования метанооксиляющего фильтра этих экосистем является нарушение растительного покрова вследствие ненормированного выпаса оленей и антропогенной нагрузки.

## **Бентосные микроцистин-продуцирующие цианобактерии в озере Байкал**

*Белых О.И., Сороковикова Е.Г., Ивачева М.А., Тихонова И.В.,  
Кузьмин А.В., Федорова Г.А.*

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, belykh@lin.irk.ru

Цианобактерии – одни из самых древних на Земле организмов – отличаются способностью сочетать два важнейших процесса в биосфере: кислородный фотосинтез и фиксацию молекулярного азота. Многие виды цианобактерий являются продуцентами токсинов, вызывающих как острые отравления человека и животных, так и хронические заболевания. Микроцистины (MC) – наиболее распространенные цианотоксины в пресноводных экосистемах, они поражают клетки печени, ингибируя активность фосфатаз. Наибольшую опасность токсины представляют при массовом развитии цианобактерий в водоемах. Возникновение вредоносных «цветений» является лучшим индикатором развивающегося эвтрофирования водоемов. В оз. Байкал микроцистин-продуцирующие цианобактерии впервые выявлены нами в 2010 г., они обнаружены в планктоне литоральной зоны.

Начиная с 2011 г. в экосистеме Байкала зарегистрирован крупномасштабный кризис, основной чертой которого стало заболевание губок, перешедшее в их массовое вымирание (Timoshkin et al., 2016). На больных и погибших губках, на камнях и на грунте в большом количестве стали развиваться нитчатые цианобактерии (Belykh et al., 2016).

Для поиска токсин-продуцирующих цианобактерий в бентосе оз. Байкал и с целью оценки угрозы загрязнения вод цианотоксинами в 2015-2016 гг. были отобраны пробы и исследованы с помощью микроскопических и генетических методов и с применением иммуноферментного анализа (ИФА).

В бентосных пробах, отобранных с различных субстратов в Южном Байкале, наблюдали нитчатые цианобактерии *Tolypothrix distorta*, *Oscillatoria curviceps*, *Kamptonema formosum*, *Symplocastrum* sp., *Tychonema* sp., *Pseudanabaena* spp., *Leptolyngbya* spp. С помощью генетических маркеров в обрастаниях различных субстратов, включая больные губки, выявлены цианобактерии способные к синтезу микроцистинов. Концентрация MC в биопленках, по данным ИФА, достигала 3.39 мкг/г сухого веса. Методом MALDI-TOF в бентосных пробах определены более 10 вариантов микроцистинов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в бентосных биопленках озера Байкал присутствуют токсин-продуцирующие цианобактерии, представляющие угрозу для человека и животных, поэтому необходимо проводить регулярный мониторинг содержания цианотоксинов, особенно в туристско-рекреационных зонах с интенсивной антропогенной нагрузкой.

*Работа выполнена в рамках проекта РФФИ №16-54-44035 Монг\_а и гос. задания № 0345-2016-0003.*

# Микробиоценоз байкальских эндемичных губок *Lubomirskia baicalensis* в норме и патологии

Н.Л. Белькова<sup>1,2</sup>, Н.Н. Деникина<sup>1</sup>, А. Мартынова-Ван Клей<sup>3</sup>, С.И. Феранчук<sup>1,4</sup>, С.И. Беликов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, nlabelkova@gmail.com

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск,

<sup>3</sup>Stephen F. Austin State University TX, USA

<sup>4</sup>Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

Губки – фильтрующие бентосные животные играют важную роль в экосистеме оз. Байкал. С 2011 г. выявляются нарушения структуры фитоценозов прибрежной зоны озера и появляются первые особи аномально окрашенных губок *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1771) (Бормотов, 2011; Тимошкин и др., 2014; Kravtsova et al., 2014). В настоящее время гибель губок отмечают во многих районах озера, связывая это явление с возросшей антропогенной нагрузкой (Тимошкин и др., 2015), массовым развитием цианобактерий (Belykh et al., 2016) и с изменением физико-химических характеристик воды озера (Деникина и др., 2016). Целью настоящего исследования стал анализ микробиомов *L. baicalensis* до появления заболевания и первых аномальных форм.

Образцы губок были собраны летом 2010 и 2011 гг. в прибрежной зоне пос. Листвянка. Суммарную ДНК выделяли коммерческим набором ДНК-сорб В, метагеномный анализ V4–V8 переменных районов 16S рДНК проводили на реактивах и секвенаторе Illumina (США). Для биоинформационной обработки использовали сервисы RDP pipeline, Mothur.

Число полученных последовательностей варьировало от 11955 до 63365, при этом доля последовательностей, идентифицированных только на уровне крупных таксонов варьировала от 26,2 до 30,8%. Высокая доля неклассифицированных филотипов отмечена среди представителей фил Proteobacteria, Verrucomicrobia и Planctomycetes. Аномальная окраска губок может быть вызвана дисбиотическими нарушениями в симбиотических микробных сообществах. Так, отмечены изменения структуры и представленности таких фил как Cyanobacteria/Chloroplast и Verrucomicrobia: в аномально окрашенной губке хлоропласты заменяются цианобактериями, а среди Verrucomicrobia увеличивается представленность неклассифицированных филотипов и класса Spartobacteria, а уменьшается – Verrucomicrobiae. Кроме того, в этих губках отмечено существенное уменьшение доли и представленности Bacteroidetes и Proteobacteria на фоне увеличения Actinobacteria, Planctomycetes и Candidatus Saccharibacteria. Индексы разнообразия показывают более низкое богатство видов в губке, где наблюдаются дисбиотические проявления (Chao 1683) по сравнению с микробными сообществами зеленых губок (5785 и 5450). Таким образом, гибель губок может быть связана с неконтролируемым развитием видов, чужеродных для здоровых особей и обуславливающих дисбиотическое состояние и нарушение устойчивости микробного сообщества.

## Разнообразие кишечных микробиоценозов на ранних стадиях развития байкальских сиговых рыб и их гибридов F1

Белькова Н.Л.<sup>1,2</sup>, Сидорова Т.В.<sup>1</sup>, Феранчук С.И.<sup>1,3</sup>, Глызина О.Ю.<sup>1</sup>, Яхненко В.М.<sup>1</sup>, Сапожникова Ю.П.<sup>1</sup>, Смирнов В.В.<sup>4</sup>, Смирнова-Залуми Н.С.<sup>4</sup>, Суханова Л.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, nlabelkova@gmail.com

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск

<sup>3</sup>Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск

<sup>4</sup>Байкальский музей ИНИЦ СО РАН, Иркутская обл., Листвянка

Искусственная гибридизация сиговых рыб проводится в «Пресноводном аквариальном комплексе» ЛИИ СО РАН с 2010 г. Выращивание гибридного (F1) и негибридного потомства осуществляется в нескольких установках, где предусмотрена возможность контроля за системой регулирования различных параметров среды обитания гидробионтов (температура, освещение, состав воды) (Глызина, 2012).

Известно, что омуль и сиг различаются по спектрам питания. Байкальский омуль – пелагический планктофаг, потребляющий как зоопланктон, так и более крупные кормовые объекты – макрогектопуса, личинок и молодь голомянко-бычковых рыб, гаммарид, вместе с нерпой замыкает пищевую цепь в толще. Байкальский озерный сиг – зоофаг с широким спектром питания. Молодь (до трех лет) питается преимущественно рачковым планктоном, особи старшего возраста – зообентосом, воздушно-наземными насекомыми и рыбой. Озерный сиг максимально использует донные биоценозы. В лабораторных условиях культивировали как чистые линии байкальского омуля (*Coregonus migratorius* Georgi), озерного сига (*C. baicalensis* Dyb., озерно-речного сига *C. pidschian* Gmelin), так и гибриды F1, для получения которых использовалась как омулевая, так и сиговая икра. Принципиальной являлась однотипность условий развития икры и содержания рыб: одинаковый корм, температура, аэрация и объем аквариумов. Различия заключаются только в генетической составляющей потомства. Варибельность кишечных микробиомов оценивали в ПЦР в реальном времени и пиросеквенированием V4-V6 варибельных районов 16S рРНК.

Метагеномным анализом в составе кишечных микробиомов личинок сига и гибридов определены филы: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Deinococcus-Thermus и Acidobacteria. Принципиальное различие – это наличие более высокой доли Deinococcus-Thermus и Acidobacteria у личинок сига и практически их полное отсутствие у гибридов. Также отмечено уменьшение доли Actinobacteria, Bacteroidetes и Firmicutes у личинок сига по сравнению с гибридами. С помощью ПЦР в реальном времени оценили долю Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes и Verrucomicrobia от общего количества ампликонов, детектируемых с помощью консервативных бактериальных праймеров, в кишечных микробиомах рыб.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №15-04-06847 на базе Уникальной научной установки «Экспериментальный пресноводный комплекс байкальских гидробионтов» (<http://lin.irk.ru/aqua>).

## Алкалофильные грибы в засоленных местообитаниях

Бондаренко С.А.<sup>3</sup>, Георгиева М.Л.<sup>2,3</sup>, Януцевич Е.А.<sup>1</sup>, Терешина В.М.<sup>1</sup>, Биланенко Е.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, РФ

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический  
факультет, Москва, РФ

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский  
институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе", Москва, РФ,  
[bond.sonia@gmail.com](mailto:bond.sonia@gmail.com)

Засоленные местообитания характеризуются широким разнообразием микроорганизмов, в первую очередь прокариот. Сообщества гиперсоленых озер включают в себя представителей всех основных трофических групп и обеспечивают замкнутый цикл веществ в системе. Грибы известны как важные деструкторы органики в самых разных типах почв, но в засоленных и экстремально щелочных местообитаниях их редко рассматривают как самостоятельное звено микробных сообществ, экология их слабо изучена. В фокусе наших исследований было выявление функционального звена микобиоты содовых озер и солончаков. Разработан комплекс методов для выделения грибов, адаптированных к экстремальным условиям. Накопленные за последнее десятилетие данные показали наличие в щелочных почвах вокруг содовых озер облигатно алкалофильных и алкалотолерантных грибов. Алкалотолеранты распространены широко, включая нейтральные и даже кислые почвы. Явление алкалофилии для грибов редко. Облигатная алкалофилия отмечена только у аскомицетных грибов *Sodiomyces* (*Plectosphaerellaceae*, *Sordariomycetes*) и *Thielavia* (*Chaetomiaceae*, *Sordariomycetes*). Наиболее интересен род *Sodiomyces* с видами *S. alkalinus* (отмечен в литоральной зоне содовых озер России, Монголии, Танзании), *S. magadii* и *S. tronii* с побережья содового озера Магади (Кения). Особенности морфологии и физиологии подтверждают, что эти микромицеты способны переживать постоянно чередующиеся условия засухи и затопления, образуя большое количество слизи, защищающей мицелий и споры, для них характерны замкнутые плодовые тела со своеобразным типом развития. Биохимические исследования показали, что облигатные

алкалофилы рода *Sodiomyces* обладают уникальным, не характерным для алкалотолерантов, составом растворимых углеводов цитозоля – они накапливают большое количество трегалозы, которое сохраняется и в стрессовых условиях кислых pH. Мы предполагаем, что грибы этого рода - подходящие кандидаты на роль узкоспециализированных деструкторов органики в литоральной зоне озер разных типов засоления. Недавно *S. magadii* был отмечен нами на побережье хлоридного озера Баскунчак (Россия). *Sodiomyces* spp. могут входить в состав биопленок или быть ассоциированы с цианобактериальными матами, что косвенно подтверждается составом ферментов и наличием бактериальных генов в геноме. Защелачивание, которым сопровождается процесс фотосинтеза в матах и биопленках, может объяснять высокую встречаемость облигатных алкалофилов в условиях нейтрального хлоридного засоления. Для подтверждения наших гипотез необходимы дальнейшие исследования распространения и экологии грибов рода *Sodiomyces*.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 15-04-06975, № 15-04-06260, программой фонда РФФИ, проект № 14-50-00029 (Биланенко Е.Н., работа с коллекцией грибов).*

## **Зараженность мицелиальными грибами приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* в заливе Петра Великого Японского моря**

*Борzych О.Г., Зверева Л.В.*

Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток, alien-og@mail.ru

Проведено микологическое обследование приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay) (Bivalvia) из различных районов залива Петра Великого Японского моря.

Местом отбора моллюсков выбраны Амурский залив, подверженный промышленно-бытовым стокам г. Владивостока, акватория у острова Рикорда, где располагается плантация по выращиванию двустворчатых моллюсков, и относительно чистые акватории залива Восток.

С поверхности раковины и из внутренних органов приморского гребешка выделены изоляты 72 видов мицелиальных грибов из 30 родов сумчатых грибов, их анаморфных стадий и зигомицетов.

Комплекс мицелиальных грибов – ассоциантов приморского гребешка из Амурского залива составляет 35 видов грибов из 16 родов, из них 33 вида анаморфных микромицетов из 14 родов, 1 сумчатый гриб *Chaetomium globosum* и 1 зигомицет *Pilaira anomala*.

Комплекс мицелиальных грибов – ассоциантов приморского гребешка из акватории у о. Рикорда составляет 39 видов мицелиальных грибов из 19 родов, из них 30 видов анаморфных грибов из 15 родов, 4 вида сумчатых грибов из 3 родов, 4 вида зигомицетов из рода *Mucor*; 1 неспорулирующий мицелий.

Комплекс грибов - ассоциантов приморского гребешка из залива Восток составляет 14 видов из 8 родов, из них 13 видов анаморфных грибов из 7 родов и один зигомицет *Rhizopus stolonifer*.

Отмечена низкая степень сходства видового состава комплексов грибов приморского гребешка, собранного в районах, различных по состоянию окружающей среды и степени антропогенной нагрузки.

Показано, что видовое богатство условно – патогенных и токсинообразующих мицелиальных грибов, в первую очередь грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Chaetomium* во внутренних органах двустворчатых моллюсков возрастает в антропогенно-нарушенных прибрежных водах.

Штаммы, полученные в ходе исследования, хранятся в Биоресурсном центре "Морской биобанк" ННЦМБ ДВО РАН.

*Исследования морских мицелиальных грибов поддержаны проектами "Дальний Восток" № гос. регистрации АААА-А16-116101110095-6, № ФАНО 0268-2015-0022 и № гос. регистрации АААА-А16-116101110096-3, № ФАНО 0268-2015-0020.*



# Сульфатредуцирующие бактерии в аэробных водах Чёрного моря

Брюханов А.Л.<sup>1,2</sup>, Захарова Е.Е.<sup>2</sup>, Пименов Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,  
биологический факультет, Москва

<sup>2</sup>ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Москва, brjuchanov@mail.ru

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) традиционно считаются строго анаэробными микроорганизмами, но их обнаруживают и в ряде местообитаний, подвергающихся воздействию кислорода. Многие СРБ обладают эффективными популяционными и ферментативными механизмами защиты от окислительных стрессов, кроме того, клетки СРБ могут быть ассоциированы со взвешенными органическими частицами, внутри которых существуют анаэробные микрзоны. В морских экосистемах процесс сульфатредукции обычно происходит в донных осадках, однако в некоторых морях восстановленные условия могут создаваться и в водной толще. Характерным примером является Чёрное море – крупнейший в мире меромиктический водоём.

На континентальном шельфе Чёрного моря процесс сульфатредукции был обнаружен не только в глубинной анаэробной водной толще, насыщенной сероводородом, но и в подповерхностных кислородсодержащих водах и в зоне хемоклина на глубинах до 170 м, где численность СРБ составляла от 0,1 до 9% от общего микробного числа. На этих верхних водных горизонтах с помощью вложенной ПЦР были выявлены участки гена 16S рРНК СРБ, принадлежащих к филогенетическим подгруппам *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfobacter*. Последовательности участков маркерного гена *dsrB* (кодирующего β-субъединицу диссимиляционной (би)сульфитредуктазы), разделенных с помощью DGGE, показали наибольшую гомологию черноморских СРБ с некультивируемыми морскими сульфатредукторами из различных местообитаний и сформировали на филогенетической дендрограмме отдельные кластеры.

Из аэробных вод Чёрного моря впервые была выделена в чистую культуру СРБ, описанная как новый вид *Desulfofrigus euxinos*. В геноме данной психрофильной аэротолерантной бактерии, использующей широкий круг доноров электронов, были найдены различные ключевые гены, ответственные за поглощение кислорода и детоксикацию его активных форм (*coxA*, *cydA*, *sod*, *roo*, *dfx*, *rbr*, *bfr*).

Работа была выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 10-04-00220-а и 12-04-91052-НЦНИ\_a (PICS #6041).

## Биопленкообразование *Listeria monocytogenes* с микроорганизмами, выделенными из пищеварительного тракта мидии грея (*Grenomytilus grayanus*) и морской воды

Бузолева Л.С.<sup>1,2</sup>, Ким А.В.<sup>1</sup>, Еськова А.И.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, <https://www.dvfu.ru>

<sup>2</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, <http://niiem-vlad.ru>

Известно существование *L. monocytogenes* в морской среде (Вou-m'handi, et al., 2007). Привнесение их может быть связано с паводковыми и грунтовыми водами (Онищенко, 2003), с загрязнением вод канализационными стоками (Онищенко, 2003; Зуев, 2004). Попадание патогенов в морскую среду представляет опасность для морской биоты, так, согласно литературным источникам, в природе морские мидии могут подвергаться воздействию различных типов патогенных бактерий, в частности, *L.monocytogenes* (Qi Zhu, et al., 2017). Зараженные *L.monocytogenes* двустворчатые моллюски регулярно являются причиной вспышек листериоза во всем мире (Takahashi, et al., 2009), морская среда не является благоприятной для существования патогенных бактерий, поэтому возможность образовывать биопленки является

одним из механизмов адаптации листерий и способствует сохранению и поддержанию их численности в этих условиях.

**Цель работы** – изучить способность *Listeria monocytogenes* формировать биопленки с микроорганизмами, выделенными из пищеварительного тракта мидии Грея (*Grenomytilus grayanus*).

В работе использованы 11 штаммов *L. monocytogenes* из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова. В качестве тест-культур были отобраны 15 штаммов, выделенных из желудочно-кишечного тракта мидии и 312 штаммов из морской воды. Для изучения биопленкообразования при температуре 22°C использовали модифицированный метод Christensen G.D. et al.(1985). Всего проведено 165 вариантов опыта.

**Результаты и обсуждения.** Была определена способность штаммов *L. monocytogenes* к биопленкообразованию в монокультуре и в ассоциации с бактериями из пищеварительного тракта мидии и морской воды. На основании проведенных исследований было установлено, что высокими биопленкообразующими свойствами в ассоциации с листериями обладали штаммы, отнесенные к роду *Pseudomonas*. Исследование динамики роста показало, что зрелая биопленка как у *L. monocytogenes*, так и у псевдомонад в монокультуре образуется за 3 суток, а в ассоциации у листерий происходит за вторые сутки, а у *Pseudomonas sp.* – за третьи.

Таким образом, было показано, что образование биопленки с морскими сапротрофными микроорганизмами, в частности с бактериями родов *Pseudomonas sp.* способствует сохранению и поддержанию численности *L. monocytogenes* в морской среде.

## **Возрастные изменения микробиома отделов респираторного тракта пациентов с муковисцидозом**

*Воронина О.Л., Рыжова Н.Н., Кунда М.С., Аксенова Е.И., Шарпова Н.Е.,  
Кондратьева Е.И., Гинцбург А.Л.*

ФГБНУ “Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Министерства здравоохранения РФ, Москва  
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, olv550@gmail.com

**Введение.** Автохтонная микробиота отделов респираторного тракта – одно из первых звеньев защиты от вдыхаемых патогенных микроорганизмов. Однако нарушение мукоцилиарного клиренса при муковисцидозе (МВ) приводит к усилению притока аллохтонных микроорганизмов, с которыми еще труднее сражаться организму пациента при обструкции и респираторных заболеваниях. Проведенное нами ранее исследование микробиоты параназальных синусов (ПНС) и нижних отделов респираторного тракта у пациентов с МВ показало, что лаваж ПНС, трахеальный аспират и мокрота являются информативными образцами в изучении микробиоты. Выработанные критерии «здорового» микробиома позволили определить эффективность лечения по увеличению таксономического разнообразия микробиоты пациента с появлением таких филумов как Firmicutes, Bacteroidetes и Actinobacteria. В тоже время у детей, как правило, берут для обследования образцы, требующие меньшего инструментального вмешательства: смывы со слизистой носоглотки (ССН) и орофарингеальные мазки (ОФМ). В задачу настоящего исследования входил анализ бактериома в образцах ССН и ОФМ у детей разного возраста с диагнозом МВ в разных фазах течения заболевания.

**Материалы и методы.** Образцы мокроты, ССН и ОФМ пациентов с МВ в возрасте 3 месяцев - 17 лет анализировали с помощью массового.

## **Разнообразие фототрофных бактерий в цианобактериальных матах гидротермальных источников Алла и Умхей (Баргузинская долина)**

<sup>1</sup>Гайсин В.А., <sup>1</sup>Бурганская Е.И., <sup>1</sup>Груздев Д.С., <sup>2</sup>Рысина М.С., <sup>1</sup>Брянцева И.А., <sup>3</sup>Бархутова Д.Д.,  
<sup>1</sup>Патутина Е.О., <sup>1</sup>Горленко В.М., <sup>1</sup>Кузнецов Б.Б.

<sup>1</sup>ФГУ «Федеральный исследовательский центр

<sup>2</sup> «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва, vasil.beingi@gmail.com

Работы последних пяти лет, посвященные исследованию термальных источников «Octopus Springs» и «Mushroom Springs» (Yellowstone, Северная Америка), дают, пожалуй, самую полную картину разнообразия хлорофототрофных прокариот, населяющих маты высокотемпературной зоне гидротерм. Однако не меньший интерес представляет зона умеренных температур. В этой связи нами было выполнено комплексное исследование матов из гидротерм Умхей (Um15) и Алла (A115) (Баргузинская долина, Бурятия). Анализ образцов включал послойное определение пигментов, исследование состава морфотипов и бактериального разнообразия с помощью метода высокопроизводительного секвенирования последовательностей домена V3-V4 гена 16S рРНК (MiSeq, Illumina).

Анализ результатов секвенирования выявил, что в матах источника Умхей, отобранных в условиях с близкими температурами (около 40°C), доля фототрофных бактерий была схожа и составляла 43, 44 и 64% в точках Um15-1, 2 и 3, соответственно. Разнообразие фототрофных бактерий в матах Умхей незначительно варьировало от 29 до 41 OTU. В то же время доля фототрофных бактерий в матах источника Алла значительно варьировала: 51% в наиболее прогреваемой точке A115-1 (до 54°C) и 5% в мезофильной точке A115-3 (до 38°C). В точке A115-1 наблюдалось самое высокое разнообразие — 49 OTU, а в точке A115-2 самое низкое 13 OTU.

В большинстве точек основную долю фототрофов составляли цианобактерии (73-85%), но в точках Um15-2 и A115-2, основную долю составляли АНФБ рода *Roseiflexus* — 56 и 71%, соответственно. Значительное развитие *Roseiflexus* sp. в мезофильных условиях Умхей было неожиданностью. В точке Um15-1 была обнаружена мезофильная АНФБ '*Chlorolinea* sp.' (3.5% от всех фототрофов). Анализ филогенетического разнообразия АНФБ выявил, что в A115-3, Um15-1 и 2 присутствуют в значимом количестве бактерии клады *Chlorolinea*-подобных бактерий. Также в этих точках обнаружены OTU, относящиеся к кладе, описанных в этом году термофильных АНФБ: '*Candidatus Chloranaerofilum corporosum*' и '*Candidatus Roseilinea gracile*'. Кроме того в среднетемпературной точке Um15-1 относительно больше представлены пурпурные серные и несерные бактерии. Можно заключить, что разнообразие фототрофных бактерий в среднетемпературной зоне горячих источников значительно, и, возможно, обусловлено переходным температурным значением этой экологической зоны.

## Роль эндофитных бактерий в фитобиоме

<sup>1</sup>Гарипова С.Р., <sup>2</sup>Умаров М.М

Башкирский государственный университет, Уфа, [garisveta@rambler.ru](mailto:garisveta@rambler.ru)  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, [mumarov@mail.ru](mailto:mumarov@mail.ru)

Фитобиом — интерактивный геном всех связанных с растением организмов, преимущественно непатогенных, обеспечивающих его элементами питания, защищающих от биотических и абиотических стрессов. Ключевым детерминантом здоровья и продуктивности растения является ассоциированный с ним микробиом, который предоставляет растению недостающие в конкретных условиях среды функции благодаря сложным регуляторным взаимодействиям между макро- и микросимбионтом.

Эндофитные бактерии — наименее изученная часть микробиома растения. Это бессимптомные обитатели внутренних тканей растений, обнаруженные во всех исследованных видах. Их местообитание включает корни, стебли, листья, цветки, плоды, семена. Колонизация эндосферы растения в процессе онтогенеза происходит преимущественно через ризосферу, но возможна и через филлосферу. Вопрос о передаче микробиома «по наследству» через семена пока не решен. Растение опознает «дружественную» микробиоту и поддерживает приемлемый уровень плотности клеток бактерий от 10<sup>2</sup> до 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> КОЕ/г сырой массы в зависимости от органа, стадии развития и возраста растения. Механизмы этого контроля не ясны.

Разнообразие эндофитных бактерий составляет более 200 видов и 70 родов которые распределенные по высшим таксонам прокариот в соотношении: Proteobacteria 54% (alpha-proteobacteria — 18%, beta-proteobacteria — 10%, gamma-proteobacteria — 26 %), Actinomycetes 20%, Firmicutes — 16%, Bacteroidetes — 6 %, Archae — 4 %. Более 40 % выявленных эндофитов — некультивируемые на обычных микробиологических средах бактерии. В разных

географических зонах и видах растений, в разных локациях макросимбионта отмечено преобладание определенных групп и видов эндофитных бактерий. Однако для понимания роли эндофитных бактерий необходима не столько информация о таксономическом составе метагенома, сколько анализ о его метаболома.

Особая экологическая ниша эндофитных бактерий предполагает наличие у эндофитов молекулярных сигналов опознавания их макросимбионтом, способность самостоятельного внедрения во внутренние ткани растения и их заселения, не вызывающего активной системной защиты. Микробиологическими и физиолого-биохимическими методами выявлено, что эндофитные бактерии способны: проявлять к антибиоз к фитопатогенам, индуцировать иммунитет растений, оказывать регулирующее влияние на ростовые процессы за счет синтеза ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, АБК, АЦК-деаминазы и детоксикации активных форм кислорода, утилизировать пестициды, осуществлять сбор и хранение железа, мобилизовать фосфаты. Анализ кодирующих белки последовательностей метагенома эндофитов показал, что эндофитные бактерии обладают генами ключевых ферментов N<sub>2</sub>-фиксации, денитрификации и нитрификации, что указывает на их участие в цикле азота. Оценка вклада этих процессов в азотное питание растений – перспектива ближайших исследований. Таким образом, эндофитное сообщество бактерий играет важную роль в продукционном процессе растений и обеспечении устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам.

## Молекулярная экология и биогеография магнитотактических бактерий

Груздев Д.С.<sup>1</sup> Козяева В.В.<sup>1</sup> Узун М.М.<sup>1,2</sup> Ракова А.И.<sup>1,2</sup> Рысина М.С.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии, «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва, denisgrouzdev@gmail.com

<sup>2</sup>ФГБОУВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва

<sup>3</sup>ФГОУВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Долгопрудный

Способность микроорганизмов к биологически контролируемой минерализации привлекает многих исследователей из-за высокой степени генетического контроля образования сложных комплексов неорганических и органических материалов, которые необходимы микроорганизму для различных функций. Магнитотактические бактерии (МТБ) известны своей уникальной способностью синтезировать внутриклеточные кристаллы магнетита или грейгита, окруженные липопротеиновой мембраной. Способность формировать магнетосомы объединят разнообразных по физиологии, морфологии и филогении бактерий, которые широко распространены в донных осадках различных водных экосистем. Несмотря на значительный прогресс в изучении МТБ, многие вопросы остаются малоизученными. К их числу можно отнести вопросы влияния факторов окружающей среды на биоразнообразие различных групп МТБ.

В настоящей работе были исследованы сообщества МТБ 20 мест обитания, расположенных в различных географических точках России и мира. Оценку сложности микробных сообществ и определение их состава проводили путем сравнения последовательностей суммарного амплификата V3-V4 региона гена 16S рРНК. После удаления чтений с низким качеством и химерных последовательностей, 1200466 парных чтений были объединены в 20407 операционных таксономических единиц (ОТЕ) с уровнем сходства последовательностей внутри ОТЕ более 97%. По результатам филогенетического анализа к МТБ были отнесены 66 ОТЕ. МТБ во всех образцах были представлены в разной степени и относились к 4 филумам, среди которых ранее были обнаружены МТБ. Изучение морфологии клеток МТБ выявило присутствие различных морфотипов, включая крупных кокков, диплококков, вибрионов и спирилл, различающихся количеством и формой магнетосом. Было проведено сравнение сообществ МТБ с целью установления взаимосвязи между представленностью видов и экологическими параметрами их мест обитания. Полученные результаты свидетельствуют о том, что принадлежащие филуму *Nitrospirae* МТБ наиболее

представлены в пресных источниках, в то время как в соленых их доля невелика. Для соленых экосистем установлено преобладание МТБ, относящихся к классу *Deltaproteobacteria*.

## **Структура микробных сообществ лесных, пахотных и постагрогенных серых лесных почв**

*Груздев Д.С., Рысина М.В., Кравченко И.К.*

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, [irinakravchenko@inbox.ru](mailto:irinakravchenko@inbox.ru)

Микробное сообщество почвы осуществляет в биосфере важные экологические функции, связанные с биологическим круговоротом веществ, регуляцией газового состава атмосферы, процессами формирования почв и их устойчивости к природным и антропогенным факторам. В то же время, сведения о влиянии антропогенных воздействий и их последствий на структуру микробных сообществ почв крайне ограничены, а механизмы их регуляции неизвестны.

С использованием метода высокопроизводительного секвенирования исследована таксономическая структура микробных сообществ серых лесных почв Московской обл. при сукцессионном переходе от агроценоза через залежи разного возраста (5-25 лет) к лесному фитоценозу. Было получено более 470 тыс. парных чтений V3-V4 региона гена 16S рПНК, которые были объединены в 3544 ОТЕ с уровнем сходства более 97%. Количество бактериальных ОТЕ в исследованных почвах составляло от 1441 до 1883. Доминантными бактериальными филами (более 10% в составе сообщества) были *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*.

В составе микробных сообществ идентифицирован ряд редких ОТЕ, которые относятся к микробным сообществам с важными биогеохимическими характеристиками. Примером таких организмов являются метанотрофы, которые регулируют процесс газообмена метана между почвой и атмосферой. В почвах агроценоза обнаружены представители *Methylocystaceae*, доля которых составляет 0,08%-0,14% от состава сообщества, в то время как в лесной почве их доля значительно снижается и составляет от 0,02% до 0,07%. В почве лесного биоценоза обнаружены 5 ОТЕ, относящиеся к *Verrucomicrobia* subphylum 6, к которому принадлежат все известные к настоящему времени метанотрофные веррукомикробии (*Methylacidiphilum*, *Methyiacidimicrobium*). Напротив, в почвах агроценозов и залежей только в одной из точек были обнаружены 2 ОТЕ, относящиеся к *Verrucomicrobia* subphylum 6 (0,02%). Доля данных бактерий варьирует от 0,06% до 0,71% и имеет достоверную положительную корреляцию ( $p < 0.05$ ) с возрастом залежи.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-04-00136.*

## **Микробиологические параметры молодых почв отвалов карьера по добыче известняков, Ленинградская область**

*Дмитракова Я.А.<sup>1</sup>, Абакумов Е.В.<sup>1</sup>, Иванова Е.А.<sup>1,2,3</sup>, Першина Е.В.<sup>1,2</sup>, Кимеклис А.К.<sup>1,2</sup>, Зверев А.О.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФГБНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, [ektrnivanova@gmail.com](mailto:ektrnivanova@gmail.com)

Увеличение территории нарушенных земель в результате разработки и добычи полезных ископаемых представляет собой особую экологическую проблему. Высокий адаптивный потенциал почвенных микроорганизмов, способных приспосабливаться к любым изменениям среды, позволяет использовать структуру микробиома в качестве одного из наиболее чувствительных экологических индикаторов, маркирующих стадии почвовосстановления.

Результаты исследований карьера «Печурки» (Сланцевский р-н, ЛО), свидетельствуют о высоких темпах педогенного преобразования субстрата. Основные процессы преобразования минеральной части – химическое, биохимическое и физическое выветривание карбонатных пород; ключевые процессы – накопление органического вещества и окисление субстрата. Большинство почв характеризуется фульватно-гуматным типом гумуса с повышенной долей гуминовых кислот вследствие карбонатности почвообразующей породы.

Содержание микробной биомассы варьировало от 0,98 до 4,60 мкг С/г почвы, при этом значения увеличиваются со сроком зарастания. Образцы характеризовались абсолютным доминированием филотипов *Proteobacteria* (55,7%), за ними следуют представители *Actinobacteria* (17,0%), *Bacteroidetes* (10,3%), *Acidobacteria* (6,4%), и *Chloroflexi* (3,8%). Доминирующими таксонами в молодых отвалах были *Acinetobacter* (8,8%), *Micrococcaceae* (8%) и *Pseudomonas* (6%). В средневозрастных отвалах преобладали представители *Micrococcaceae* (4,5%) и *Sphingomonadaceae* (1,4%). Старовозрастные отвалы демонстрировали высокую долю в сообществе *Bradyrhizobiaceae* (5%), *Chitinophagaceae* (2,9%) и *Hyphomicrobiaceae* (2,5%), данные образцы характеризуются также увеличением доли *Micromonosporaceae* и *Sinobacteraceae*. Показано, что самым сильным фактором является возраст отвалов, при этом наблюдалось отчетливое обособление микробиомов старых (35 и более лет) отвалов. Анализ микробиома и сопряженный анализ растительного покрова разновозрастных отвалов известкового карьера показал, что лучшим способом рекультивации карбонатных карьеров, с точки зрения биоразнообразия, является создание благоприятных физических условий субстрата и самозарастание участка. При этом, возвращение отвальных земель в сельско-хозяйственное использование требует дорогостоящих мероприятий по выполаживанию территории и нивелированию гетерогенности субстрата, что является экономически затратным.

*Работа выполнена при поддержке РФФ, грант № 17-16-01030.*

## **Структурно-функциональные перестройки микроорганизмов при адаптации к экстремальным факторам внешней среды**

*Дмитриев В.В., Звонарев А.Н.*

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

В докладе представлен комплексный подход для исследования структурных адаптационных возможностей микроорганизмов на уровне клеток, популяций и сообществ, сочетающий в себе новые подходы для ультраструктурного и светооптического анализа в сочетании с биохимическими возможностями объяснения обнаруженных явлений. На физиологических ситуациях показана специфическая пластичность поверхностных и экзоцеллюлярных компонентов микробной клетки, позволяющая им выживать в конкретном специфическом биотопе. Было показано, что объединяющим свойством большинства микроорганизмов является наличие лабильного полисахаридного компонента, который может служить матрицей для создания структур, необходимых микробным клеткам в зависимости от физиологической ситуации. Особое внимание в работе уделено трофическому взаимодействию микроорганизмов с окружающей средой. На примере дрожжей, бактерий и мицелиальных грибов, утилизирующих углеводороды нефти, поверхностно-активные вещества, растительные субстраты и др. было показано, что первичной адаптивной реакцией является модификация наружных полисахаридных компонентов клеточной оболочки. Было показано, что эти изменения коррелируют со структурными изменениями цитоплазматической мембраны, являющейся составляющей клеточной оболочки микроорганизмов. Для доказательства участия экзоцеллюлярных структур в первичной деградации ростовых субстратов были применены новые методы, позволившие локализовать на поверхностных структурах клетки продукты реакции на окислительные ферменты, гидролазы ПАВ, липазы, цитохром P 450.

Впервые для ультраструктурного анализа бактериальных ассоциатов утилизирующих углеводороды нефти и характеристики особенностей их трофических взаимодействий был применён метод трёхмерной компьютерной реконструкции серийных срезов. Было показано, что микробные ассоциаты, структурируют в жидкой среде пространство, путём образования трофосом.

## Новые вид и подвид рода *Agreia* из галлов, индуцированных на растениях нематодами подсемейства *Anguininae*

Дорофеева Л.В.<sup>1</sup>, Присяжная Н.В.<sup>1</sup>, Стародумова И.П.<sup>1,2</sup>, Тарлачков С.В.<sup>1,3</sup>, Василенко О.В.<sup>1</sup>, Чижов В.Н.<sup>4</sup>, Субботин С.А.<sup>4</sup>, Евтушенко Л.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

<sup>2</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино

<sup>3</sup>Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

<sup>4</sup>Центр паразитологии, Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, dorof@ibpm.pushchino.ru

Род *Agreia* (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinobacteria*) в настоящее время включает два вида – *A. bicolorata* и *A. pratensis*, которые характеризуются высоким уровнем сходства генов 16S рРНК (99.4%). Вид *A. bicolorata* (с красно-оранжевой окраской колоний) обнаружен в листовых галлах на вейнике (*Calamagrostis neglecta*), индуцированных нематодой *Heteroanguina graminophila* (Моск. обл.). Представители *A. pratensis* (желтые колонии) выделены из филлосферы трав (Германия).

Изученные нами новые штаммы изолированы из галлов на листьях вейника и из галлов на стебле пырея (*Elymus repens*), пораженном нематодой *Anguina agropyri*. Их сходство с известными видами *Agreia* по генам 16S рРНК – 99.5-99.9%.

Сравнительный анализ МАЛДИ масс-спектров бактерий показал, что *A. bicolorata* ВКМ Ас-1804<sup>T</sup> и 3 изолята из вейника образуют тесный МАЛДИ-кластер. Несколько отстоит от них штамм ВКМ Ас-2052, выделенный из того же источника. ВКМ Ас-1783 из галлов на пырее обособлялся по МАЛДИ масс-спектрам как от группы *A. bicolorata*, так и от штамма *A. pratensis* ВКМ Ас-2510<sup>T</sup>.

Согласно результатам филогеномного анализа, величина средней идентичности нуклеотидов (average nucleotide identity, ANI) для геномов типовых штаммов видов *A. bicolorata* и *A. pratensis* – 86.9%, а уровень ДНК-ДНК гибридизации *in silico* (dDDH) – 32.8%. Эти значения соответствуют величинам ANI и dDDH, определенным между геномом ВКМ Ас-1783 и геномами типовых штаммов (86.3% и 89.2%; 32.2 и 38.1%), и значительно ниже показателей границ видов (ANI=95-96%, dDDH=70%). Эти данные, а также значимые отличия на уровне фенотипа, указывают на то, что ВКМ Ас-1783 является представителем нового вида рода *Agreia*. Напротив, высокие показатели сходства геномов ВКМ Ас-2052 и *A. bicolorata* Ас-1804<sup>T</sup> (ANI=98.2%, dDDH=84.3%) говорят о принадлежности ВКМ Ас-2052 к геномовиду *A. bicolorata*. Вместе с тем, штамм не образует характерного для *A. bicolorata* красно-оранжевого пигмента и отличается от известных видов рода по составу полисахаридов клеточной стенки, компонентам МАЛДИ масс-спектров и ряду физиолого-биохимических признаков. Подобные отличия позволяют относить штамм ВКМ Ас-2052 к новому подвиду *A. bicolorata*.

Таким образом, результаты филогеномного анализа и изучения фенотипических характеристик демонстрируют, что штамм ВКМ Ас-1783 (99.8% сходства с *A. pratensis* ВКМ Ас-2510<sup>T</sup>, 16S рРНК) представляет собой новый вид в составе рода *Agreia*, а ВКМ Ас-2052 (99.9% сходства с тем же штаммом, ВКМ Ас-2510<sup>T</sup>) может быть описан в качестве нового подвида *A. bicolorata*.

### Соотношение С/Н/Р в биомассе почвенных микроорганизмов как показатель адаптации микробного сообщества к абиотическим стрессам

Дударева Д.М.<sup>1,2</sup>, Евдокимов И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, ИФХиБПП РАН, darya\_dudareva@mail.ru

<sup>2</sup>Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения, РАН, Пущино, ИФХиБПП РАН, ilyaevd@yahoo.com

Глобальные изменения климата приводят к увеличению частоты и интенсивности экстремальных климатических событий - резких изменений температуры и количества осадков. Такие абиотические стрессы кардинально изменяют круговорот элементов в экосистемах, воздействуя на C/N/P в биомассе почвенных микроорганизмов.

Целью наших исследований было оценить, насколько абиотические погодные стрессы изменяют соотношение биофильных элементов в составе биомассы почвенного микробного сообщества. Мы предположили, что экстремальные погодные события активизируют механизмы акклиматизации и адаптации почвенного микробного сообщества, вызывая «переключения» сообщества с состояния активного роста до статуса поддержания и обратно. Это должно проявляться в резких изменениях соотношения C/N/P в составе микробной биомассы и водорастворимых форм. В инкубационном эксперименте изучали изменение соотношения C/N/P в микробной биомассе в чернозёме выщелоченном (варианты: NPK, неудобренный, черный пар) под воздействием высушивания-увлажнения и замораживания-оттаивания. Микробную биомассу определяли фумигационным методом.

Внесение удобрений не влияло на содержание микробного C, но повышало величины микробного N и P, снижая C/N и C/P с 17 до 6 и с 42 до 13, соответственно. После абиотического стресса при высушивании-увлажнении в вариантах без удобрений и на пару происходит волнообразное изменение C/N в составе микробной биомассы, а в варианте с NPK – снижение C/N в 2 раза. При замораживании-оттаивании происходит повышение C/N только в варианте без удобрения и в NPK, а не на пару. После увлажнения высушенной почвы отмечается снижение C/P до 3-4 во всех вариантах. Затем в почве без удобрения и на пару величины C/P увеличиваются до 94 и 115, соответственно. При замораживании-оттаивании в вариантах без удобрений и NPK соотношение C/P не изменяется, а на пару - снижается.

Таким образом, наша рабочая гипотеза подтвердилась; содержание микробного P оказалось чувствительным к замораживанию-оттаиванию, а азота - к высушиванию-увлажнению. Воздействие абиотических стрессов на стехиометрию C/N/P оказалось сопоставимым с внесением минеральных удобрений. Наиболее резкое высвобождение C, N и P под воздействием абиотических стрессов происходит на неудобренных или бедных питательными элементами почвах.

Данное исследование проводилось при поддержке фондов РФФИ (проект № 14-14-00625) и РФФИ (проект № 17-04-01933).



## **Почвенно-микробиологические подходы к реконструкции исходного содержимого ритуальных сосудов археологических памятников**

<sup>1</sup>Дущанова К.С., <sup>2</sup>Хомутова Т.Э., <sup>2</sup>Борисов А.В.

<sup>1</sup>Пушкинский государственный естественнонаучный институт, dushchanova.kamilla@gmail.com

<sup>2</sup>Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино

Актуальной задачей археологического почвоведения является реконструкция исходного содержимого ритуальных сосудов - элемента погребального обряда многих археологических культур, отражающего особенности палеоэкономики древних сообществ. Изменение состояния микробных сообществ и ферментативного пула в почвенно-грунтовой материале сосудов предполагается оценить спустя достаточно длительный период их захоронения. В настоящей работе представлен почвенно-микробиологический подход к реконструкции содержимого сосудов погребальных комплексов степной зоны России. Исследован материал из 22 сосудов 19 погребений 6 курганов срубной культуры могильника Неткачево (XVI-XV вв. до н.э., Волгоградская обл.). Определено содержание фосфолипидов, фосфатов, валового фосфора и серы, а также ферментативная активность арил-сульфатазы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидазы, целлюлазы, ксилозидазы, хитиназы, лейцин-аминопептидазы, кислой фосфомоноэстеразы, фосфодиэстеразы, пиродифосфат-фосфодиэстеразы и щелочной фосфомоноэстеразы.

При исходном наличии пищи в сосудах придонный грунт отличался от фонового более высоким содержанием фосфора, серы, подвижных фосфатов и фосфолипидов. По данным активности ферментов углеродного, азотного, фосфатного и серного циклов сосуды были разделены на 3 группы. Высокие значения активности ферментов всех циклов в одной из групп позволили предположить исходное присутствие высокопитательного продукта, возможно мясного в сочетании с жиром. Снижение ферментативной активности в других группах указывало на снижение питательности исходного продукта. Установлено, что в почвенно-грунтовой материале ритуальных сосудов погребальных комплексов эпохи бронзы спустя 3,5 тыс. лет сохраняется живая микробная биомасса и ферментативная активность, по которым возможна реконструкция исходного содержимого этих сосудов.

*Работа выполнена при поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ, грант №17-06-00412)*

## **Изучение матрикса биопленки, образованной *Azospirillum brasilense* Sp245, методом ИК-фурье-спектроскопии**

*Дятлова Ю.А., Камнев А.А., Евстигнеева С.С., Федоненко Ю.П., Тугарова А.В.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов,  
jdyatlowa2013@yandex.ru

В естественных условиях более 95% микроорганизмов существуют в форме биопленок – стабильных пространственно и метаболически структурированных микробных сообществ, заключенных в образуемый ими внеклеточный сложный биополимерный матрикс, которые обычно локализуются на границе раздела фаз. В последние годы активно изучается структура и состав биопленок, образованных различными видами бактерий, в том числе бактериями рода *Azospirillum* – распространенными во многих климатических зонах грамотрицательными ризобактериями, способными колонизировать корневую систему и стимулировать рост и развитие растений.

В этой работе впервые с помощью инфракрасной (ИК) фурье-спектроскопии были изучены зрелые биопленки (5 сут.), образованные штаммом *A. brasilense* Sp245. Данный спектроскопический метод основан на регистрации колебательных переходов функциональных групп в (макро)молекулах и в настоящее время находит все более широкое применение в различных микробиологических исследованиях.

Был изучен матрикс биопленок (МБ), предварительно отделенный от клеток центрифугированием, а также его различные компоненты. ИК-спектры МБ оказались сходными с таковыми для клеток, что указывает на аналогичное соотношение макрокомпонентов – белков, углеводов и др. – в их составе. Образец МБ, разделенный на колонке с носителем Sepharose CL-6B, дал две фракции с различными молекулярными массами (МБ1 и МБ2). ИК-спектры МБ1 и МБ2 показали разные соотношения полисахаридных и белковых компонентов. Кроме того, высокомолекулярная углеводсодержащая фракция (МБ3) была получена путем мягкого кислотного гидролиза МБ с последующим разделением при помощи гель-проникающей хроматографии на колонке Sephadex G-50. Этот образец давал интенсивные полосы на ИК-спектре, соответствующие полисахаридной части, а также четко разрешимые, но значительно менее интенсивные полосы, соответствующие пептидной связи, возникающие, по-видимому, из-за неполного гидролиза белковой составляющей. Таким образом, ИК-фурье-спектроскопия позволила провести сравнительный анализ основных сложных биомакромолекул как самого матрикса биопленки *A. brasilense* Sp245, так и его отдельных компонентов.

*Работа поддержана грантом РФФИ 17-08-01696-а.*

## **Актинобактерии: эволюция парадигмы и современное состояние исследований**

*Евтушенко Л.И.*

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

Актинобактерии (ранее «лучистые грибки», актиномицеты) относятся к филуму Actinobacteria, одному из наиболее древних и обширных бактериальных филумов, который охватывает 6 классов – *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* and *Thermoleophilia*. Актинобактерии выделяются среди других прокариот высоким содержанием Г+Ц пар в ДНК (до 74.4 моль%) и рядом других общих черт организации генома. Превосходят все известные группы микроорганизмов по способности синтезировать биологически активные соединения, в том числе антибиотики (образуют свыше половины из более чем 10000 зарегистрированных к настоящему времени). Характеризуются высокой степенью отличий по морфологии и размерам (от мицелиальных форм и сложных репродуктивных структур – до кокков и ультрамикрочорм), физиологии (аэробы, анаэробы, термофилы, психрофилы и т. д.), а также огромным разнообразием состава и структур полимеров клеточной стенки. Обитатели различных наземных и водных экосистем, входят в состав микробиомов человека, животных и растений. Среди актинобактерий имеются патогены человека, животных и растений, в т.ч., образующие фитопатогенные комплексы «бактерия-нематода».

В докладе обсуждаются основные вехи в эволюции представлений о разнообразии, экологии и биотехнологическом потенциале этой группы микроорганизмов – с момента обнаружения (70-е годы XIX в.) и до наших дней. На примере актинобактерий иллюстрируется эволюция критериев и границ вида и высших таксонов прокариот – как на уровне генома, так и в терминах фенотипических характеристик (по данным литературы и результатам собственных исследований). Приводятся обоснования видового порога уровня сходства генов 16S рРНК (98.65%), а также показатели сходства последовательностей полных геномов (ДНК-ДНК гибридизация *in silico*, ANI, TETRA) для штаммов одного вида. Демонстрируются примеры принадлежности к разным видам бактерий, имеющих высокий уровень сходства 16S рРНК генов (99.5% и более). На примере родов семейств *Microbacteriaceae* и *Nocardioideae* иллюстрируется таксономическая специфичность состава и структуры гликополимеров клеточных стенок – что представляет интерес, в том числе, в связи с проблемой разграничения близкородственных видов на уровне фенотипа. Обсуждаются перспективы развития исследований обсуждаемой группы микроорганизмов.

# Влияние бесменного выращивания льна-долгунца на микробиологическое сообщество почвы

Ефремов Г.И.

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, факультет Почвоведения, агрохимии и экологии, Москва, gleb\_efremov@mail.ru

В результате многократного культивирования сельскохозяйственных растений одного вида на одном и том же поле (монокультура) неизбежно наступает прогрессирующая утрата плодородия [2]. Это явление называют “почвоутомлением”, одним из причин которого считают изменение микробного сообщества почвы.

Цель исследования – провести сравнительное изучение микробного сообщества почвы при бесменным выращивании льна-долгунца и в севообороте.

Объектом исследования служили образцы почвы, отобранные с Длительного полевого опыта ТСХА, заложенного А.Г. Дояренко в 1912 г[1]- “лен в севообороте” и “лен бесменный”.

Численность микроорганизмов определяли методом посева на плотные питательные среды (среда ГПА и агар Чапека, сусло агар), идентификацию бактерий и микромицетов проводили по фенотипическим признакам и на основании анализа нуклеотидных последовательной 16S РНК.

Численность бактерий в варианте “лен в севообороте” составляет  $170 \cdot 10^4$  КОЕ/г абс. сух. почвы, в варианте “лен монокультура”  $63 \cdot 10^4$  КОЕ/г абс. сух. почвы. Сообщество микроорганизмов в варианте “лен в севообороте” обильнее, чем варианте “лен монокультура”. Численность микромицетов в варианте с севооборотом составляет  $73 \cdot 10^4$  КОЕ/г абс. сух. почвы. В варианте “лен монокультура” с  $68 \cdot 10^4$  КОЕ/г абс. сух. почвы. Таким образом существенных отличий по численности по вариантам среди микромицетов не выявлено. В варианте с севооборотом больше видов микромицетов: *Aspergillus niger.*, *Trichoderma sp.*, *Aaspergillus sp.*, и 4 морфотипа рода *Penicilium*. В варианте “лен монокультура”: *Aspergillus niger.*, *Trichoderma sp.*, *Aaspergillus sp.*, и один морфотип *Penicilium*, образующий кроваво-красный пигмент. В варианте с севооборотом выделено и идентифицировано 20 морфотипов бактерий *Bacillus megaterium* (11 штаммов), *B. subtilis*, *B. koreensis strain BR03022*, *B. velezensis strain S3-1* *B. arybhatai*, *B. Sp. Ralstonia pickettii* (3 штамма), *R. syzyglia*. В варианте “лен монокультура” выделено и идентифицировано 17 морфотипов бактерий: *Bacillus megaterium* (5 штаммов), *B. subtilis* (11 штаммов) и *B.sp.* Доминирующими видами являются бактерии р. *Bacillus*. В варианте “лен в севообороте” большее разнообразии видов *Bacillus*, чем в варианте “лен монокультура”, а также присутствуют бактерии р. *Ralstonia*, которых нет в варианте “лен монокультура”.

## Изменения микробиома в процессе первичного почвообразования в тундровой зоне

Железова А. Д.<sup>1,2</sup>, Чернов Т. И.<sup>1</sup>, Тхакахова А. К.<sup>1</sup>, Бгажба Н. А.<sup>1,2</sup>, Куттовая О. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва,

<sup>2</sup>МГУ им. М.В. Ломоносова, ф-т почвоведения, Москва, alferrum@mail.ru

Микробиом почв является важным компонентом биогеохимических циклов макро - и микроэлементов в почве. Закономерности формирования почвенного микробиома могут быть изучены в процессе первичного образования или восстановления почвы. В данной работе динамика структуры и разнообразия почвенного микробиома изучена на разных стадиях закрепления минерального субстрата растительностью в тундровой зоне.

Были исследованы образцы двух хронорядов, представляющих последовательное закрепление песка на берегах р. Печора, около пос. Нельмин Нос и г. Нарьян-Мар. Отбор проб производили с трёх типов поверхности: незакрепленный перевеваемый песок, полужакрепленная поверхность с разрастаниями мхов (*Racomitrium canescens*, г. *Polytrichum*) и лишайников (*Stereocaulon paschale*), фоновая почва с типичной тундровой растительностью. Почву отбирали из слоя 1-5 см по возможности без частей растений, в пятикратной

повторности с каждого типа поверхности, точки отбора располагались в 3-5 метрах друг от друга.

Из образцов почвы была выделена тотальная ДНК с помощью коммерческого набора MPBio FastDNA® SPIN Kit for Soil по методике производителя. Методом количественной ПЦР (ПЦР-Real Time) в образцах было оценено количество копий рибосомальных генов бактерий, архей и грибов, а также количество копий функциональных генов, связанных с процессами азотного цикла.

Выявлено закономерное увеличение количества копий фрагментов бактериальной и архейной 16S рРНК, а также грибной 18S рРНК в хронорядках от незакрепленного песка до фоновой почвы, причем разница достигала двух порядков. Количество копий рибосомальных генов бактерий возрастало от  $1,8 \cdot 10^9$  до  $1,5 \cdot 10^{11}$ , архей и грибов – от  $1,2 \cdot 10^8$  до  $1,6 \cdot 10^{10}$ . Схожая закономерность распределения в хронорядках прослеживалась для количества копий генов *nifH* (фиксация азота), *amoA* (нитрификация), *nirK* и *nirS* (денитрификация). Количество копий *nirK* было наибольшим (до  $10^{10}$ ) во всех исследованных образцах по сравнению с другими функциональными генами ( $10^6$ - $10^8$ ). Кластерный анализ количественных показателей выявил различия между микробиомами двух фоновых почв и сходства между микробиомами незакрепленных и полужакрепленных поверхностей.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-16-01057).*

## **Метаногены и ацетогены в анаэробных илах над газогидратами и в зонах нефтепроявления озера Байкал**

*Жилина Т.Н., Груздев Д.С., Колганова Т.В., Пименов Н.В.*

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.  
Москва, zhilinat@mail.ru

Озеро Байкал уникальный пресноводный бассейн, расположенный в тектонически активной зоне, что обуславливает наличие метановых и нефтяных сипов и залежей газогидратов в его осадочной толще. В донных отложениях, приуроченных к разгрузкам газо- и нефтенасыщенных флюидов, на основе секвенирования генов 16S рРНК группой Т.И. Земской установлено присутствие метаногенных архей, однако они не были получены в культуре, что представляет отдельную задачу. С этой целью мы исследовали 4 пробы ила оз. Байкал, отобранные в Кукуйском каньоне с разных горизонтов над газогидратами (GR-1; GR-2) и зонами нефтепроявления Горевого утеса (BC-6; GG-6). Был сделан посев проб со специфичными для метаногенеза субстратами на среду с низкой минерализацией и pH 7, при температуре  $6^{\circ}$  и  $18^{\circ}$ C. Через 3 и 12 месяцев в пробах был измерен метан и ацетат. При  $18^{\circ}$ C в накопительных культурах были выявлены метилотрофные и гидрогенотрофные метаногены и ацетогены. В пробах над газогидратами водород использовался исключительно на ацетогенез. Этот процесс доминировал и на  $C_1$ -метильных соединениях. В пробах зоны нефтепроявления  $C_1$ -метильные соединения использовались по преимуществу метаногенами, в то время как на водороде шло развитие и ацетогенов. На  $C_1$ -метильных соединениях метаногены были представлены кокками, на водороде и формиате палочковидными формами; ацетогены в основном были представлены спорообразующими палочками разных морфотипов. Была проведена ПЦР с использованием универсальных архейных праймерных систем для амплификации генов 16S рРНК двух накопительных культур (BC-6; GG-6) на  $C_1$  метильных субстратах и одной (GG-6/2) на  $H_2+CO_2$ . На  $C_1$  метильных субстратах выявлена одна архея, имеющая 98.4% сходства с *Methanosarcina subterranea*. На водороде присутствовало более двух видов архей, из них доминирующая близка к *Methanobacterium flexile* с 99.9% сходства. Обе археи - *Methanosarcina* sp. Z-7115 и *Methanobacterium flexile* Z-7215 были выделены в чистую культуру. С использованием универсальных бактериальных праймеров к гену 16S рРНК была получена клональная библиотека из 28, 29 и 24 клонов для BC-6, GG-6 и GG-6/2 соответственно. Все последовательности библиотеки BC-6 принадлежали представителям филума Firmicutes, причем 82% клонов близки к роду *Desulfosporomusa*, оставшиеся 18% кластеризовались внутри порядка *Clostridiales*. Из 29 клонов полученных для GG-6, 24 имели около 95% сходства с представителями рода *Sedimentibacter*, остальные относились к некультивируемым представителям порядка *Bacteroidales*. Наибольшее филогенетическое разнообразие наблюдалось в GG-6/2. Более 40% клонов были близки к недавно описанному

роду *Lentimicrobium*, остальные распределились между представителями филумов Firmicutes и Bacteroidetes. При 6<sup>0</sup>C роста и метаногенеза не выявлено было и через год после посева. Для Байкала с малым количеством сульфата в составе вод ацетогенез наряду с метаногенезом может играть существенную роль в анаэробных процессах деструкции органического вещества.  
*Работа поддержана Программой Президиума РАН 1.22П.*

## **Влияние кратковременных и длительных засух на активность гидролитических ферментов в серой лесной почве**

<sup>1</sup>Журавлева А.И., <sup>2</sup>Якушев А., <sup>1</sup>Кузнецова И.Н., <sup>1,3</sup>Благодатская Е.В.

<sup>1</sup>ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, ИФХиБПП РАН, zhuravlevaai@gamber.ru

<sup>2</sup>Факультет почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

<sup>3</sup>Факультет агропочвоведения, Гёттингенский университет, г. Гёттинген, Германия

Глобальные изменения климата приводят к увеличению продолжительности и частоты засух в умеренной климатической зоне. Насколько изменятся активность, способность к восстановлению и кинетические свойства гидролитических ферментов, участвующих в разложении органического вещества, остается невыясненным.

Эффект засух моделировали в полевом манипуляционном эксперименте на серой лесной почве. Определяли кинетические параметры  $V_{max}$  и  $K_m$  для пяти гидролитических ферментов:  $\beta$ -1,4-глюкозидазы (BG;  $\beta$ -D-glucopyranoside), катализирующей разложение целлобиозы до глюкозы; целлобиогидролазы (CBH; b-D-cellobioside), ответственной за гидролиз целлюлозы до целлобиозы; N -acetyl-D-глюкозоаминоазидазы (NAG; N-acetyl- $\beta$  D-glucosaminide), гидролизующей хитин и пептидогликан; ксиланазы (Xyl;  $\beta$ -D-xylopyranoside), участвующей в разложении линейных полисахаридов до ксилозы и фосфатазы, участвующей в трансформации фосфорсодержащих соединений.

Влияние засух на величину  $V_{max}$  было фермент-специфичным, только для двух ферментов наблюдалось снижение  $V_{max}$  в ходе кратковременной засухи, тогда как длительная засуха привела к снижению величины четырех из пяти определяемых ферментов. Длительная засуха снижала  $V_{max}$  для фосфатазы, целлобиогидролазы и ксиланазы, при этом  $V_{max}$  хитиназы увеличилась в 4 раза, тогда как  $V_{max}$  и  $K_m$   $\beta$ -глюкозидазы не изменялись. После кратковременной засухи кинетические параметры почти всегда восстанавливались до уровня контрольных значений. Последствие длительной засухи сохранялось даже спустя неделю после увлажнения и выражалось в том, что  $V_{max}$  и  $K_m$  фосфатазы, целлобиогидролазы и хитиназы отличались от контроля в 1.5 – 3 раза. Засухи обратимо снижали каталитическую эффективность ( $K_a$ ) для четырех ферментов (исключая глюкозидазу), для которой наблюдалось 3-4 кратное увеличение  $K_a$ . Длительная и кратковременная засухи в основном влияли и изменяли величину  $V_{max}$  по сравнению с  $K_m$ . Таким образом, ферментативная система реагировала консервативно, изменяя сначала концентрацию, а затем - активность ферментов.

## **Синтрофное взаимодействие алкалофильных анаэробных бактерий *Geoalkalibacter ferrihydriticus* и *Candidatus Contubernalis alkalaceticum***

Заварзина Д.Г., Чистякова Н.И., Грачева М.А., Антонова А.В., Чернов М.С., Меркель А., Жилина Т.Н.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, zavarzinatwo@mail.ru.

В 2005 году нами была описана первая алкалофильная облигатно-синтрофная бактерия *Candidatus Contubernalis alkalaceticum*, способная окислять ацетат, этанол а также некоторые другие органические соединения в бинарной культуре с гидрогенотрофными сульфидогенами. В настоящей работе сульфидоген в синтрофной ассоциации был заменен на железоредуцирующую бактерию *Geoalkalibacter ferrihydriticus*.

Исследования проводили на среде с синтезированным ферригидритом (СФ), в качестве акцептора электронов для *G. ferrihydriticus* и этанолом (20 мМ) как субстратом для *Candidatus C. alkalaceticum*. Соотношение бактерий в данных условиях, определенное методом высокопроизводительного секвенирования участков гена 16S РНК показало, что клетки *Candidatus C. alkalaceticum* составляют 10% от общего числа клеток, при этом они были четко ассоциированы с восстановленными *G. ferrihydriticus* в магнетит частицами СФ. В связи с этим были исследованы также варианты с минералами, содержащими атомы двухвалентного железа – синтезированным магнетитом [Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>] и природным сидеритом [FeCO<sub>3</sub>], а также рост на среде, содержащий только этанол. Во всех трех вариантах синтрофная культура росла, устойчиво окисляя этанол, хотя соотношение клеток, определенное вышеуказанным методом, было обратное: клетки *Candidatus C. alkalaceticum* составляли 90% от общего числа клеток.

На среде с СФ условия благоприятствовали преимущественному развитию *G. ferrihydriticus*: помимо водорода, образующимся при межвидовом переносе, он мог использовать этанол, и ацетат в качестве донора электронов. Магнетит стабильная фаза при pH 9.0, дальнейшее восстановление которой энергетически не выгодно. Сидерит может быть только окислен, поскольку содержит исключительно атомы двухвалентного железа. Как показали наши исследования (Zavarzina et al., 2016) *G. ferrihydriticus* обладает способностью анаэробно окислять железо, используя карбонат в качестве акцептора электронов. В вариантах с магнетитом и сидеритом, а также на среде с этанолом *G. ferrihydriticus* выступал как ацетоген, интенсивно используя водород, образующийся при окислении этанола *Candidatus C. alkalaceticum*. В этих случаях условия способствовали преимущественному развитию облигатного синтрофа, что нашло отражение в его абсолютном численном доминировании. По данным мессбауэровского спектрального анализа при росте на магнетите, происходило лишь его преобразование, приводящее к формированию более крупных частиц с правильной стехиометрией без образования новых фаз, в то время как при росте на сидерите 10 % этого минерала окислялось в смесь магнетита и оксигидроксикарбоната. Как и в случае с СФ клетки облигатного синтрофа были строго ассоциированы с частицами минералов. Возможно, *Candidatus C. alkalaceticum* способен к анаэробному окислению железа. Это предположение требует дальнейших исследований.

*Работа поддержана Программой Президиума РАН 1.22П.*

## **Экология подледных микробных сообществ уникальных озёр Якутии (оз. Лабынкыр, оз. Ворота)**

*Захарова Ю.Р.<sup>1</sup>, Башенхаева М.В.<sup>1</sup>, Копырина Л.И.<sup>2</sup>, Лихошвай Е.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

<sup>2</sup>Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН Якутск, zakharova@lin.irk.ru

На территории Якутии насчитывается более 723 тысяч озер, 26 из которых признано уникальными, за счет своих размеров, глубин, историко-этнографической значимости, богатства природных ресурсов и лечебными свойствами грязевых отложений. Однако ни одно из них в настоящее время не имеет полных сведений о составе и разнообразии бактерио- и фитопланктона. Озера Лабынкыр и Ворота являются крупными и глубоководными, кроме того Лабынкыр входит в список уникальных. В связи с этим, целью работы было оценить количественный и качественный состав бактерио- и фитопланктона озер Лабынкыр и Ворота, с учетом их морфометрических и гидрохимических особенностей. Лабынкыр – озеро тектонического происхождения, расположенное в верховье реки Индигирка на высоте 1020 метров над уровнем моря, на Сордоннохском плато. Водоем протянулся с севера на юг на 14 км, его ширина около 4 км, средняя глубина 50–60 метров. Оз. Ворота расположено в 23 км к востоку от оз. Лабынкыр. Длина озера – 3,5 км, максимальная ширина достигает 1 км, глубина в пелагиали 40–60 м. В подледный период (апрель и май) 2016 г. проведены комплексные исследования состава бактерио- и фитопланктона, а также химического состава воды. Пробы отбирали на трех станциях в северной, центральной и южной части озера Лабынкыр и на одной станции в северной части озера Ворота. Отбор подледных проб проводила группа водолазов подводно-исследовательского отряда РГО (г. Череповец) и ЛИИ СО РАН (г. Иркутск).

В исследуемый период озера были полностью покрыты снегом, в апреле толщина снежного покрова составляла 27–37 см, толщина льда достигала 106 см. Температура водной

толщи варьировала от 1,2 °С до 3,5 °С; подо льдом составляла 0,4 °С. Подо льдом развивались различные группы микроводорослей: диатомовые, динофитовые, зеленые, хризофитовые и криптофитовые, наибольшей численности достигали представители рода *Cyclotella* (Bacillariophyta). В подледных сообществах на границе вода-лед ОЧМ варьировала от  $0,4 \times 10^6$  кл./мл до  $1 \times 10^6$  кл./мл, а в водной толще составляла в среднем  $4 \times 10^5$  кл./мл. Максимальное количество культивируемых психрофильных бактерий выявлено в северной части озера Лабынцы до 330 КОЕ/мл, в средней и южной части численность была незначительной (34 КОЕ/мл и 12 КОЕ/мл, соответственно). В озере Ворота наибольшие значения психрофилов отмечены в верхних слоях воды (73 КОЕ/мл), с глубиной их количество снижалось. Изолированные чистые культуры бактерий (около 50 штаммов) представлены короткими палочками, кокковидными и дрожжеподобными клетками. По результатам анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемые штаммы были отнесены к родам *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Janthinobacterium*, *Micrococcus* и *Cryptococcus*, ближайшими гомологами которых являются бактерии, выделенные из антарктических озер, ледников и почвы.

Авторы выражают благодарность А.А. Долженкову за содействие в проведении полевых работ.

*Работа выполнена в рамках проектов ФАНО «Экспериментальные исследования геномов и протеомов биоты пресноводных экосистем» 0345–2016–0005 и «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения разнообразия растительного мира Северной и Центральной Якутии» АААА-А17-117020110056-0.*

## **Микроорганизмы, участвующие в процессе восстановления железа в низкотемпературных экосистемах**

*Захарюк А.Г., Щербакова В.А.*

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

Учитывая, что железо относится к химическим элементам с переменной валентностью и является одним из самых распространенных в земной коре, окислительно-восстановительные реакции с участием этого элемента имеют большое значение для поддержания значительных микробных популяций в почве и осадках.

Микроорганизмы, восстанавливающие железо в мезофильных (20 – 45°C) и термофильных (>45°C) условиях в настоящее время достаточно хорошо изучены. Установлено, что они филогенетически и физиологически весьма разнообразны и встречаются среди многих классов *Bacteria* и *Archaea*. Показано, что в некоторых морских, пресноводных и почвенных экосистемах восстановление железа микроорганизмами – основной процесс, обеспечивающий окисление органического вещества. Между тем, значительно менее изучен процесс микробной железоредукции в низкотемпературных экосистемах нашей планеты и бактерии, которые осуществляют этот процесс. На современном этапе развития микробиологии, биотехнологии и нанотехнологии эти микроорганизмы привлекают внимание для решения таких теоретических и практических проблем, как создание микробных топливных элементов, электрон-проводящих цепей, происхождение и эволюция жизни на Земле.

Нами были получены психрофильные культуры железовосстанавливающих бактерий, из различных низкотемпературных экосистем, способные восстанавливать соединения железа (III) с формиатом, в качестве единственного источника углерода и донора электронов. В качестве терминальных акцепторов электронов были использованы такие распространенные формы микробиологически восстанавливаемого железа как слабокристаллический оксид железа в виде синтетически синтезированного ферригидрита и растворимый цитрат железа. Выделенные культуры были представлены грам-отрицательными факультативно анаэробными бактериями, отнесенными к семейству *Clostridiaceae*, восстанавливающими железо (III) при температуре культивирования 7 и 15°C. Также в ходе работы нами была выделена психрофильная органотрофная бактерия – штамм В1, которая являлась спутником железовосстанавливающих бактерий.

Дальнейшие исследования новых железоредукторов и их спутников в микробном сообществе позволят определить механизмы устойчивости их клеток к воздействию

экстремальных факторов среды их обитания и определить экологическую роль этих микроорганизмов в микробных сообществах низкотемпературных экосистем.

## **Анализ устойчивости к антимикробным препаратам колиформных бактерий, выделенных из поверхностных водных объектов города Рязани**

*Зацаринная Е.А., Ефремова Е.С., Гаськова А.С., Калчугина В.Д., Трунякова А.С.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Рязанский государственный университет имени С.А. Есенина», Рязань, microbiog@mail.ru

С целью оценки антибиотикорезистентности среди общих колиформных бактерий (ОКБ) из 21 поверхностного водного объекта г. Рязани в летний период 2016 г. было выделено 775 изолятов. Среди выделенных колиформ идентифицированы представители 8 родов: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Hafnia* и *Pantoea*.

Устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) среди представителей данной группы распространена повсеместно. Доля культур, чувствительных ко всем изученным АМП, ничтожно мала (0,5%). Тогда как колиформы с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) составили 82,5%. Количество культур с фенотипом экстремальной резистентности составило 37,9%.

Рассматривая резистентность к отдельным АМП, требуется отметить достаточно высокий уровень резистентности к бета-лактамам антибиотикам: в частности к ампициллину резистентно 61% изученных изолятов, к имипенему – 60,5%, к цефепиму (IV поколение цефалоспоринов) – 53%. В тоже время устойчивость к цефалоспорином I–III поколения в большинстве водных объектов оказалась значительно ниже, порядка 30-40%. Примерно такой же уровень устойчивости анализируемые колиформные бактерии проявляли в отношении антибиотиков группы аминогликозиды: к амикацину резистентными оказались 39,5% культур, к гентамицину – 26,6%, к торбамицину – 23,3%.

Самым эффективным препаратом среди всех групп АМП, *in vitro* подавляющим рост исследуемых ОКБ, оказался ципрофлоксацин: только 2% изолятов устойчивы к его воздействию. Малое количество устойчивых вариантов обнаружено и к ко-тримоксазолу (триметоприму-сульфаметоксазолу) (5,6%), однако чувствительность к данному препарату составила только 66,6%. Резистентность к фурадонину, тетрациклину и левомицетину составила 30,6%, 23,5% и 15,2% соответственно, а чувствительность около 50%.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в изученных поверхностных водных объектах происходят существенные качественные изменения их микробиоценозов: наблюдается их перестройка, значительно повышается доля антибиотикорезистентных штаммов.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Рязанской области в рамках научного проекта № 16-44-620157 "p\_a".*

## **Разнообразие микроорганизмов-нефтедеструкторов Финского залива Балтийского моря в зимний и летний период**

*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 РАН, Пущино, tatiz@ibpm.pushchino.ru

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 углеводов 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. Опероны деградации нафталина через салицилат и гентизат (*nag*) присутствуют у штаммов *Burkholderia* и *Delftia*, причём для штаммов *Delftia* spp. наличие *nag*-генов показано впервые. Кроме того, последовательности гена салицилат 5-гидроксилазы, *nagG*, содержат штаммы *Achromobacter*, *Sphingobacterium* и *Stenotrophomonas*.

Данная работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта – RFMEFI161615X0038.

## **Активность и разнообразие аэробных метанотрофов в покрывающей почве подземного хранилища газа**

Каллистова А.Ю.<sup>1,2</sup>, Меркель А.Ю.<sup>1</sup>, Снакин В.В.<sup>2,3</sup>, Доронин А.В.<sup>2</sup>, Тарновецкий И.Ю.<sup>3</sup>, Власов С.В.<sup>2</sup>, Пименов Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РФ, Москва, kallistoanna@mail.ru

<sup>2</sup>ООО «Энергодиагностика», Москва, office@energo-diagnostics.ru

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, snakin@mail.ru

Подземные хранилища газа (ПХГ) используемые для хранения природного газа геологические структуры или искусственные резервуары являются потенциальным источником эмиссии метана. В мире действует около 680 ПХГ с суммарной рабочей емкостью 413 млрд м<sup>3</sup>. Потеря природного газа из ПХГ происходит через негерметичные технологические узлы и неплотные перекрывающие геологические породы. Несмотря на констатацию потерь газа, доступно крайне мало информации о реальных величинах эмиссии CH<sub>4</sub> с поверхности ПХГ. В мировой литературе также отсутствуют данные об оценке метаноокисления в покрывающих ПХГ почвах. Известно, что метанотрофные микроорганизмы, окисляя метан, значительно снижают эмиссию этого парникового газа из различных источников. Настоящая работа является первым исследованием активности и разнообразия аэробных метанотрофных бактерий в почве ПХГ. Покрывающую почву отбирали с глубины 0.5 м в нескольких экспериментальных точках Инчукалнского ПХГ (АО «Латвияс Газе», Латвия), созданного в водоносных пластах. Концентрация CH<sub>4</sub> на глубине отбора проб варьировала от 0.015 до 2.5 об. % (вблизи скважин). Потенциальную метанооксиляющую активность определяли в аэробных условиях в инкубационных экспериментах при 10 и 25°C. Разнообразие бактерий и архей определяли методом высокопроизводительного секвенирования V3–V4 гипервариабельных участков гена 16S рНК. Показано, что в почве ПХГ сформирован естественный метанотрофный биофильтр, обладающий достаточно высокой (сравнимой со свалочными почвами) аэробной метанооксиляющей активностью: максимальная метанооксиляющая активность при 25°C и 10°C составляла 2.3–3.7 и 0.7–2.1 мкмоль CH<sub>4</sub>/г сух. вещества почвы/сут., соответственно.

Молекулярный анализ выявил высокое таксономическое разнообразие бактерий в почве ПХГ, причем состав сообщества различался в зависимости от образца. Среди метанотрофных гаммапротеобактерий преобладали представители родов *Methylobacter* и *Crenothrix*. В отдельных образцах увеличивалась доля *Methylococcus*, *Methylomonas* и *Methylomicrobium*. Среди метанотрофных альфапротеобактерий преобладали представители рода *Methylocapsa* и семейства *Methylocystaceae* (*Methylocystis*, *Methylorhizus* и некультивируемые бактерии). В дальнейшем, путем мониторинга эмиссии  $\text{CH}_4$  *in situ*, планируется оценить эффективность аэробного метаноокисления нативными почвами ПХГ.

## Природное разнообразие углеводородокисляющей микробиоты нефтезагрязненных объектов как основа биоремедиации

(итоги 30-летних исследований)

Карасева Э.В., Худокормов А.А., Карасев С.Г., Самков А.А., Волченко Н.Н.,  
Лень Н.Н., Мамонтова Ю.А., Ярыш И.А.

Кубанский государственный университет (ФГБОУ ВО "КубГУ"), Краснодар, biotech@kubsu.ru

Исследование микробиоты нефтезагрязненных объектов представляет значительный интерес для задач микробиологии и биотехнологии, поскольку не только расширяют наши представления о биоразнообразии, но и вносят решающий вклад в процессы биоремедиации. Начало этих работ относится к 80-м годам прошлого века. Из буровых растворов, нефтезагрязненных почв различного типа, нефтезагрязненных грунтов, нефтешламов как свежих, так и длительных сроков хранения, буровых отходов, доставляемых из различных регионов страны, выделены и идентифицированы методами полифазной таксономии свыше 900 штаммов микроорганизмов, способных утилизировать нефть и нефтепродукты. По совокупности признаков все изоляты были классифицированы в соответствии с современной филогенетической систематикой. Все они принадлежали, в основном, к филумам: *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Наиболее часто встречающиеся роды: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Georgenia*, *Rhizobium*, *Lysobacter*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardioideis*, *Micrococcus*, *Agromyces*, *Streptomyces*.

Велико видовое разнообразие выделяемых культур: четыре вида псевдомонад, по пять видов родококков, гординий, бацилл и пр.. Среди относительно редко встречающихся видов интерес представляли: *Exiqubacterium auranticum*, *Gordonia alcanivorans*, *Bacillus berengensis*, *Arthrobacter crystallopoietes* и др. Неидентифицированные культуры отнесены по совокупности признаков к классам *Gamma*протеобактерии, *Bacilli* и *Actinobacteria*. Все эти культуры выделялись в процессе биоремедиации загрязненных нефтью почв, грунтов, детоксикации нефтешламов и буровых отходов. Для большинства штаммов была изучена способность окислять отдельные нефтепродукты, индивидуальные углеводороды, отношение к температуре, устойчивость к повышенным концентрациям *NaCl*, тяжелым металлам. Для ряда штаммов, обладающих максимальной степенью окисления нефти, получены сведения о эмульгирующей активности, способности продуцировать биосурфактанты и адгезины. Биоремедиация земель, нарушенных в результате техногенного воздействия, осуществлялась на основе строго научного подхода, где на первый план выступает микробиологический мониторинг, то есть контроль за состоянием формирующегося микробиоценоза и корректировка процесса биодеградации поллютантов введением недостающих компонентов. При ликвидации последствий нефтяного разлива в зависимости от типа почвы, глубины ее поражения, характера и степени углеводородного загрязнения использовалась биоремедиация *in situ* путем стимуляции аборигенной микробиоты и формирования необходимого ценоза под постоянным контролем его состава.

Таким образом удалось вернуть в сельскохозяйственное пользование с полным восстановлением плодородия свыше 50 га земель в ЮФО. Микробиологическая очистка нефтезагрязненного грунта и детоксикация нефтешламов проводилась *ex situ* на специальных площадках и полигонах с дополнительным обогащением углеводородокисляющими бактериями и фиторемедиацией.

# Влияние азота на сопряженную трансформацию микробным сообществом почвы органического вещества и глинистых минералов

*Квиткина А.К., Алексеева Т.В.*

ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино,  
aqvia@mail.ru, alekseeva@issp.serpukhov.su

Отношение углерода к азоту (C/N) – важный показатель качества растительного опада, поступающего в почву, используемый для моделирования процессов минерализации и гумификации органического вещества (ОВ) микробным сообществом почв. Целью исследования было оценить влияние величины C/N на трансформацию ОВ и иллита в ряду повышения устойчивости к разложению.

Глюкозу, целлюлозу или лигнин инкубировали при 22° С (460 сут) с минеральным субстратом (песком или смесью песка с иллитом 4:1), добавляли раствор NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, доводя соотношение C/N в пробах от 2 до 300. Пробы инокулировали суспензией чернозема выщелоченного (опытная станция НИИ кукурузы, Воронежская область). Эмиссию CO<sub>2</sub> определяли газохроматографически, состав структурных фрагментов ОВ методом твёрдофазной <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии. Преобразование песка и иллита оценивали методами инфракрасной спектроскопии и рентген-дифрактометрии.

За время эксперимента минерализовалось до CO<sub>2</sub> 3.5% лигнина, 20-40% целлюлозы, 60-85% глюкозы. Величины оборачиваемости лабильного пула целлюлозы, глюкозы и лигнина были одного порядка (20-90 сут). Значения оборачиваемости стабильного пула составили 6-18 лет для целлюлозы и 75-170 лет для лигнина.

Преобразование иллита с глюкозой до каолинита и хлорита наблюдалось уже при C/N 6, а с лигнином и целлюлозой - при C/N 50 и 300, соответственно. Дефицит азота приводил к наиболее активному выветриванию иллита. При C/N 300 происходила максимальная трансформация иллита в каолинит и хлорит, повышалось содержание смектитовых слоев. Азот оказывал противоположное действие на трансформацию иллита и глюкозы. Избыток азота приводил к усилению трансформации лабильного ОВ (глюкозы) до алифатических и ароматических фрагментов, при этом преобразование иллита было минимальным. Снижение C/N до 6 при разложении глюкозы приводило к снижению содержания О-алкилов с одновременным накоплением алкилов (25%), арилов (14%) и карбоксильных групп (11%), т.е. к накоплению прогуминовых веществ. Присутствие иллита увеличивало накопление данных групп до 35, 19 и 12%, соответственно.

Таким образом, глюкоза обладала потенциалом для стабилизации за счет иммобилизации в микробной биомассе, а также трансформации в устойчивое ОВ, в том числе в виде комплексов с глинистыми минералами.

*Данное исследование проводилось при поддержке фондов РФФ (проект № 14-14-00625) и РФФИ (проект № 17-04-01933).*

## Подавление роста культуры *Aspergillus niger* растворами солей тяжелых металлов на разных стадиях обработки

*Клюева В.В., Клюев А.С., Сиротин А.А., Ляховченко Н.С.*

ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет  
(НИУ «БелГУ»)

Многие плесневые грибы способны поселяться в тех местах, где имеется минимум питательных веществ и присутствует влага. Плесневые грибы рода *Aspergillus* способны развиваться на неорганическом субстрате, таком как камень, строительные материалы, лаки, краски, металлические конструкции и электроника, вызывая повреждения и усиливая коррозию. Кроме того, такие представители как *Aspergillus* и многие другие, поселяясь в помещениях, способны наносить вред здоровью людей из-за распространения по воздуху спор.

Для борьбы с плесневыми грибами применяют как вещества органической природы, которые разлагаются в короткий промежуток времени и могут применяться для обработки

растений, почвы, так и вещества на основе солей металлов. Традиционно используют железный и медный купорос.

Данное исследование направлено на выявление чувствительности мицелия и спор плесневого гриба *Aspergillus niger* к воздействию на них солей некоторых тяжелых металлов в различных концентрациях. Полученные результаты дадут возможность подбирать необходимые вещества в минимальных концентрациях для обработки поверхностей для предотвращения заселения их *Aspergillus niger* или на разных стадиях поражения исследуемым видом грибов.

Был проведен эксперимент по исследованию влияния на *Aspergillus niger* сульфата кобальта и сульфата никеля. Для сравнения использовали уже известный реагент – сульфат меди (II). Эксперимент включал в себя обработку спор растворами в течение суток с последующим посевом на питательные среды и подсчетом проросших спор, посев суспензии спор на питательную среду, содержащую исследуемые вещества, обработку мицелия.

По результатам обработки полученных данных было выявлено, сульфат меди и сульфат никеля вызывают полное угнетение прорастания спор в концентрациях в питательной среде, превышающих 0,05 %. При концентрации 0,05% сульфата никеля наблюдали прорастание 7% спор, а сульфата кобальта – 16% от контроля. Мицелий развивался более медленно и слабо, но переходил к спорношению одновременно с контролем. Сульфат меди вызывал угнетение прорастания на более высоких концентрациях, прорастание спор на среде с концентрацией 0,1% составило 4%, концентрацией 0,05% - 34%. При нанесении растворов на мицелий, происходила гибель мицелия. Для уничтожения спор необходимы более высокие концентрации. Гибель более 50% спор при обработке сульфатом меди наблюдалась при концентрации 20%, сульфата никеля – 10%, сульфата меди – 25%.

## **Почвенные микроорганизмы как компонент постагрогенных экосистем в тундровых ландшафтах**

*Ковалева В. А.*

ФБГУН Институт биологии КомиНЦ УрО РАН, Сыктывкар, kovaleva@ib.komisc.ru

Исследования проводили на трех участках, расположенных в подзоне южной кустарниковой тундры (Воркутинский район, Республика Коми), образующих хронологический ряд: зональная тундровая экосистема - ерничково-ивняковый моховый биогеоценоз, 46-летняя постагрогенная экосистема - ивняково-ерничковый кустарничково-моховый фитоценоз, близкий по типу к целинной тундре, сформировавшийся на месте сеяного луга; 14-летняя постагрогенная экосистема - разнотравно-злаковый луг, сформировавшийся так же на основе самозаращения мятликового луга.

Исследуемые почвы характеризуются приуроченность основной массы микроорганизмов к верхним горизонтам почвы. Результаты исследований показали, что во всех вариантах исследуемых почв доля мертвых клеток составляет 14-20% от общего числа бактерий. Невысокий процент мертвых клеток является показателем того, что основу бактериального пула в верхних горизонтах почвы составляют жизнеспособные микроорганизмы. При этом численность живых бактерий выше в почве 14-летней постагрогенной экосистемы, что свидетельствует о более высокой активности бактериальной составляющей микробиоценоза этой почвы в отличие от почв ненарушенного биогеоценоза и 46-летней постагрогенной экосистемы. С глубиной при снижении общей численности бактерий доля мертвых клеток увеличивается до 55%, что связано с неблагоприятными условиями для жизнедеятельности микроорганизмов, связанных с избыточным увлажнением минеральной толщи и характерным для тундровой зоны развитием процессов оглеения. Распределение численности спор грибов и длины мицелия по почвенному профилю изучаемых экосистем аналогично распределению прокариот. В почвах ерничково-ивняковой тундры и 46-летней залежи показатели численности спор сопоставимы и относительно высокие по сравнению с почвой 14-летней залежи. Длина грибного мицелия в почвах зонального биогеоценоза и 46-постагрогенной экосистемы ниже, чем в верхнем слое почвы 14-летней.

Оценка численности разных эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов исследуемых почв показала, что в почвенном микробиоценозе доминирующее положение

занимают бактерии. Доля содержания микромицетного комплекса незначительна, численность грибов в сотни раз ниже бактерий в исследуемых почвах. Для почвы ерниково-ивняковой моховой тундры выявлена относительно высокая численность олиготрофных микроорганизмов. В почве 46-летней тундры в отличие от целинной преобладают бактерии, усваивающие органический азот и микроорганизмы, использующие минеральный источник азота, что может быть связано с наличием относительно большего количества травяных растений в напочвенном покрове, что обуславливает наличие легкоразлагаемого органического вещества. Абсолютное количество аммонификаторов значительно выше в почве 14-летней постагрогенной экосистемы.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проектов Комплексной программы УрО РАН №15-12-4-45 и Комплексной программы УрО РАН № 15-2-4-28.*

## **Микробные сообщества содовых и соленых озер Забайкалья: разнообразие и функционирование**

*Козырева Л.П., Зайцева С.В., Абидуева Е. Ю., Бурюхаев С.П., Кабилов М.Р.\**

ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

\*ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Забайкалье расположено в зоне крио-аридного климата, для которого характерно резкое колебание сезонных и суточных температур, малое количество осадков, сухость воздуха. Эти колебания оказывают сильное влияние на физико-химическое состояние мелководных содово-соленых озер, широко представленных в данном регионе. С 1995 года начаты интенсивные микробиологические исследования озер, что обусловлено интересом к ним, как местам происхождения наземного биоразнообразия, а также высокой вероятностью выделения культур, с биотехнологически значимыми свойствами (устойчивость к щелочным рН, высоким концентрациям солей) (Заварзин, 1993; Намсараев и др., 1999; Горленко и др., 1999; Sorokin et al., 2003 и др.).

Объектами наших исследований являлись озера с минерализацией от 2 до 420 г/л и рН от 8,5 до 10,5.

Установлено, что в донных осадках и микробных матах содовых и соленых озер основным терминальным процессом деструкции органического вещества является сульфатредукция. В тонких матах и поверхностных слоях донных осадков при солености до 200 г/л активности процессов продукции и деструкции сохраняются достаточно высокими. Основными факторами, определяющими активности микробных процессов, являются температура и катионно-анионный состав воды.

Исследования разнообразия микробных сообществ донных осадков, проведенные в последние годы с использованием высокопроизводительного секвенирования, выявили сходство и различия в их составе. Доминирующими филумами в микробном сообществе всех озер являются *Proteobacteria* (30-52%), *Firmicutes* (5-20%), *Bacteroidetes* (11-24%), с отличиями на уровне классов и родов. В микробном сообществе высокоминерализованного озера Борзинское выявлена существенная доля архебактерий класса *Euryarchaeota* (33%). Общей чертой микробных сообществ минеральных озер является весовая доля бактерий, участвующих на разных этапах в биогеохимическом цикле серы. Показано, что выявленные различия в таксономическом разнообразии микробных сообществ осадков щелочных озер обусловлены условиями среды обитания. Основными факторами, определяющими разнообразие бактерий, являются общая минерализация, рН, а также содержание магния, хлоридов, гидрокарбонатов, натрия, сульфатов.

Выделены в культуру более 60 представителей органотрофных бактерий, в т. ч. новые виды.

## Микроорганизмы вечной мерзлоты и их биотехнологический потенциал

<sup>2</sup>Комолова А.О., <sup>1</sup>Спирина Е.В., <sup>1</sup>Соколова Е.М., <sup>1</sup>Ривкина Е.М.

<sup>1</sup> ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино, El.Spirina@gmail.com

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, callistephus1@gmail.com

Вечная мерзлота - уникальная среда, где жизнь сохраняется в течение геологически длительного времени. Микробиологические исследования мерзлых отложений могут дать информацию о микробной жизни прошлых эпох, что может быть использовано для прогнозирования влияния микробных сообществ вечной мерзлоты на современные биотопы в случае ее деградации.

В представленной работе мы приводим результаты исследования образцов вечномерзлых отложений различного возраста и генезиса, которые были отобраны на Колымо-Индибирской низменности в 2015 году.

Было показано, что численность жизнеспособных аэробных микроорганизмов уменьшалась с увеличением возраста отложений в диапазоне от  $10^4$  КОЕ/г породы до  $10^2$  КОЕ/г породы. Разнообразие обнаруженных морфотипов было выше на разбавленной богатой среде, по сравнению с минеральной. Большинство колоний, выросших на агаризованных средах, были окрашены в желтый, оранжевый или розовый цвет, что подтверждает предположение о том, что клеточные пигменты могут оказывать положительное влияние на выживаемость и устойчивость к стрессам окружающей среды.

В ходе исследований было выделено 232 бактериальных штамма. Филогенетический анализ последовательностей 16S рДНК выявленных изолятов позволил отнести их к трем основным филумам: *Actinobacteria* -54%, *Bacteroidetes* -7% и *Proteobacteria* – 29%, из которых 25% составили представители класса  $\alpha$ -*Proteobacteria*, а 4% отнесены к классу  $\beta$ -*Proteobacteria*. Среди самой многочисленной группы *Actinobacteria* были выявлены представители родов *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Aeromicrobium*, *Kocuria*, *Plantibacter*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Fronidhabitans*, *Streptomyces*, *Nocardioides*. Род *Arthrobacter* был наиболее распространенным среди изолятов.

Исследование ферментативной активности позволило выявить штаммы с хорошо детектируемыми липазной, эстеразной, лецитиназной и целлюлазной активностями. Более 20% выделенных штаммов проявили устойчивость к таким антибиотикам как новобиоцин, ципрофлоксацин, эритромицин, пенициллин, ампициллин, канамицин и сульфаметоксазол.

## Микробные сообщества горячих источников Чукотки

Кочеткова<sup>1</sup> Т.В., Заюлина<sup>1</sup> К.С., Ельченинов<sup>1</sup> А.Г., Елизаров<sup>1</sup> И.М., Гаврилов<sup>1</sup> С.Н., Заварзина<sup>1</sup> Д.Г., Воитова<sup>2</sup> М.П., Фролов<sup>1</sup> Е.Н., Меркель<sup>1</sup> А.Ю., Тоцаков<sup>3</sup> С.В., Кубланов<sup>1</sup> И.В.

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, kochetkova.tatiana.v@gmail.com

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва

<sup>3</sup> Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Институт живых систем, Калининград

Чукотка – типичный арктический район с отрицательными среднегодовыми температурами поверхности и повсеместным развитием криолитозоны. Район Восточной Чукотки представляет собой зону с проявлениями молодого вулканизма. Среди известных гидротермальных областей этого района пять относятся к высокотемпературными (от 50 до 94 °С). Главными особенностями горячих источников Чукотки является отсутствие в них восстановленных соединений серы и водорода – основных субстратов литоавтотрофных термофильных прокариот, являющихся первичными продуцентами органического вещества в

большинстве исследованных ранее микробных сообществах наземных гидротерм, например Камчатки (Россия) и Йеллоустоунского Национального Парка (США). Другой отличительной особенностью является высокое содержание ионов металлов, которые могут служить как донорами при аэробном, так и акцепторами электронов при анаэробном дыхании. Данные особенности должны серьезным образом влиять на состав и функционирование микробных сообществ этих горячих источников. При этом, до настоящего времени никаких микробиологических исследований данных мест не проводилось.

Летом 2016 года была организована и проведена экспедиция к трем самым горячим группам источников Восточной Чукотки (Мечигменские, Сенявинские и Чаплинские гидротермальные площадки). Помимо отбора проб для выделения и культивирования термофильных микроорганизмов, во многих источниках были подготовлены препараты фиксированной тотальной ДНК проб воды и осадков для дальнейшего профилирования и метагеномного анализа. Профилирование фрагментов генов 16S рРНК проводили с использованием высокопроизводительной системы секвенирования MiSeq (Illumina, США). По результатам данной работы впервые была проведена оценка состава микробных сообществ воды и осадков природных проб горячих источников Восточной Чукотки. Основываясь на эти результаты, а также данные гидрохимии вод источников, было получено большое количество накопительных и чистых культур как автотрофных, так и гетеротрофных прокариот. Начато исследование их таксономической принадлежности и физиологии. Полученные данные помогут охарактеризовать протекающие микробиологические процессы в неисследованных ранее гидротермах, выделить новые таксоны термофильных микроорганизмов, а также оценить их роль в окружающей среде.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №17-04-01578*

## **Плазмиды псевдомонад**

*Кошелева И.А., Соколов С.Л., Сазонова О.И., Измалкова Т.Ю., Боронин А.М.*

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

Плазмиды псевдомонад привлекают к себе внимание исследователей поскольку контролируют широкий спектр свойств, включая такие важные с практической точки зрения признаки, как устойчивость к антибиотикам и способность к деградации сложных органических соединений. Исследования нашей лаборатории позволили внести вклад в классификацию плазмид псевдомонад, основанную на их способности к сосуществованию в одной бактериальной клетке, и довести количество групп несовместимости (IncP) до 14.

Наши исследования плазмид биодegradации, выделенных из почвенных псевдомонад, показали их широкое распространение, однако, если среди плазмид резистентности к антибиотикам встречаются представители всех 14 групп, то классификация выделенных плазмид биодegradации показала, что большинство из них принадлежат к группам IncP-7 и IncP-9. Было выделено 8 подгрупп плазмид IncP-9 группы и 4 подгруппы IncP-7 плазмид. Причем, для подгрупп IncP-7 плазмид характерно отсутствие корреляции между структурой их базовых репликонов и фенотипическими признаками, а для подгрупп IncP-9, наоборот, характерно наличие такой корреляции. Способность плазмид к конъюгационному переносу, а также наличие в их составе транспозонов, интегронов и IS-элементов делает их важнейшими участниками горизонтального генетического переноса, в результате чего плазмиды приобретают мозаичную структуру. Мозаичную структуру имеют также и плазмидные катаболические опероны, что характерно и для изученных нами плазмид биодegradации.

В штаммах морских псевдомонад нами также были обнаружены катаболические плазмиды IncP-7 и IncP-9 групп, однако их размеры и рестрикционные профили отличались от таковых у плазмид почвенных псевдомонад. Несмотря на достаточно широкий круг бактериальных хозяев, катаболические плазмиды P-9 группы несовместимости выделяются преимущественно из штаммов *Pseudomonas putida*, тогда как IncP-7 плазмиды чаще обнаруживаются в штаммах *P. fluorescens*.

Следует отметить, что плазмиды резистентности к антибиотикам широко распространены не только среди клинических штаммов *P. aeruginosa*, но и в самых разнообразных экологических нишах. Например, IncP-9 плазмиды резистентности, редко встречающиеся в

клинических штаммах, выделены нами как из почвенных псевдомонад, так и из штаммов *P. fragi*, изолированных из очистных сооружений.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ, уникальный идентификатор – RFMEFI161615X0038.

## Микробное разнообразие образцов позднеплиоценовых – раннеплейстоценовых многолетнемерзлых грунтов Сибири

Кудряшова Е.Б.<sup>1</sup>, Арискина Е.В.<sup>1</sup>, Карлышев А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино, katryn@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup>School of Life Sciences, SEC Faculty, Kingston University, London, United Kingdom

Изучение микробного разнообразия имеет большое теоретическое и практическое значение для развития ряда направлений исследований в области эволюции, экологии и биотехнологии. Определенный интерес представляет оценка таксономической структуры микроорганизмов древних многолетнемерзлых экосистем, площадь распространения которых составляет около четверти всей суши земного шара и около 65% территории Российской Федерации.

В настоящем сообщении представлены результаты оценки разнообразия микроорганизмов многолетнемерзлых отложений классическим методом (выделение в культуру), в сочетании с методом метагеномного анализа микробных сообществ.

Исследованы образцы позднеплиоценовых-раннеплейстоценовых многолетнемерзлых грунтов Сибири, предоставленные Д.А. Гиличинским в 2009 г. в рамках выполнения совместного проекта. Анализ частичной последовательности генов 16S рПНК изолятов, представителей геномогрупп, сформированных методом ARDRA, показал принадлежность культур к родам *Janibacter* (филум *Actinobacteria*), *Bacillus* (филум *Firmicutes*), *Chryseobacterium* (филум *Bacteroidetes*) и *Methylobacterium* (класс *Alphaproteobacteria*), *Sphingomonas* (класс *Alphaproteobacteria*), *Psychrobacter* (класс *Gammaproteobacteria*) филума *Proteobacteria*.

Полученные данные согласуются с результатами метагеномного анализа ДНК, выделенной из пробы объединенных образцов (секвенирование на платформе Illumina, MiSeq). Было получено 97,617 ридов гипервариабельного региона V3/V4 генов 16S рПНК. Филогенетический анализ, выполненный с использованием программы MSR (MiSeq Reporter Software), показал, что в изученных образцах доминировали бактерии (домен *Bacteria*), представители 21 филума, 43 классов, 88 порядков, 194 семейств, 437 родов и около 700 видов. Большинство относились к различным филогенетическим группам филумов *Proteobacteria* и *Actinobacteria* (65,41% и 25,48%); преобладали представители родов *Bradyrhizobium* и *Propionibacterium*. Значительная часть оказалась наиболее близкой к видам *Bradyrhizobium pachyrhizi* (Ramírez-Bahena *et al.* 2009), *Aminobacter aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) Urakami *et al.* 1992), *Sphingomonas oligophenolica* (Ohta *et al.* 2004), *Pseudomonas lutea* (Peix *et al.* 2004), *Rhodococcus quingshengii* (Xu *et al.* 2007), *Propionibacterium avidum* ((Eggerth 1935) Moore and Holdeman 1969) и *Oxalobacter vibrioformis* (Dehning and Schink 1990).

На всех уровнях таксономической иерархии – от вида до порядка – обнаружены также представители новых, пока не описанных таксонов.

## Структурно - функциональная характеристика микробных сообществ колонизирующих скальные поверхности пещеры Шульган-Таш (Южный Урал)

<sup>1</sup>Кузьмина Л.Ю., <sup>2</sup>Червяцова О.Я., <sup>1</sup>Галимзянова Н.Ф., <sup>3</sup>Леонова Л.В., <sup>1</sup>Рябова А.С., <sup>4</sup>Сафаров И.М.

<sup>1</sup>Уфимский институт биологии РАН, Уфа., ljkuz@anrb.ru

<sup>2</sup>ФГБУ «Государственный природный биосферный заповедник «Шульган-Таш» Республика Башкортостан

<sup>3</sup>Институт геологии и геохимии УрО РАН, г. Екатеринбург



Пещера Шульган-Таш - единственная в Восточной Евразии пещера с наскальной палеолитической живописью. Более чем 170 рисунков, нанесенных на стены 14-17 тысяч лет назад, были обнаружены в залах Купольный, Рисунков, Знаков и Хаоса. В последние годы на скальных поверхностях пещеры выявлены разнообразные колонии микроорганизмов, которые могут представлять опасность для наскальной живописи пещеры. Целью работы является исследование видового состава колоний микроорганизмов, развивающихся на минеральных субстратах пещеры, а также их участия в процессах растворения и кристаллизации кальцита.

Методом посева из микробных обрастаний со стен пещеры были выделены бактерии, актиномицеты и микроскопические грибы. При исследовании способности микроскопических грибов синтезировать кислые внеклеточные метаболиты оказалось, что 60% изолятов их продуцировали и были способны разлагать кальцит в лабораторных условиях. Группа разлагающих кальцит грибов была представлена видами родов *Penicillium*, *Fusarium*, а также стерильными формами. В составе бактериальной части сообщества доминировали актинобактерии, кроме того, были обнаружены микроорганизмы родов *Bacillus*, *Pseudomonas*, а также тионовые бактерии.

Сканирующая электронная микроскопия колоний микробных обрастаний показала присутствие в них актинобактерий, гиф микроскопических грибов и экзополимеров. В микробных обрастаниях "коричневых со светлой обводкой" (зал Купольный) микробные филаменты выявлены только по краям, а основная её часть свободна от мицелия и сложена из сфероидов (1-9.3 мкм), сидящих на теле колонии. Изучение других типов микробных обрастаний "сине-желто-серых" кроме микробных филаментов выявлено наличие гладкостенных сфероидов (диаметром 10-14 мкм), которые согласно результатам ЭДС состояли практически из чистого CaCO<sub>3</sub> с примесями алюминия, кремния, железа, фосфора и калия (менее 1% вес).

Сложный состав микробных обрастаний (грибы, бактерии, актиномицеты) на скальных поверхностях пещеры Шульган - Таш свидетельствует о том, что эти сообщества, вероятно, объединены консортивными связями, обусловленными крайней ограниченностью доступных органических субстратов. Биополимеры на поверхности микробной биомассы могут служить матрицей для кристаллизации CaCO<sub>3</sub> в виде новообразованных кристаллов и агрегатов (пустотелых сфер), что способствует формированию различных кристаллических образований перекрывающих изображения.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Башкортостан в рамках научного проекта № 17-44-020091.*

## **Микробиологический профиль погребенных почв (по данным ПЦР Real-Time) повторяет статус зональных аналогов**

*Кутовая О.В., Чернов Т.И., Тхакахова А.К., Железова А.Д., Бгажба Н.А.*

ФГБНУ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», Москва, langobard@mail.ru

Результаты молекулярно-генетических исследований почв, погребенных под археологическими сооружениями, могут представлять «архив» прошлых событий, природных условий и процессов, а также быть инструментом реконструкции почвенных биосистем прошлого. В данной работе методом ПЦР-Real Time (амплификатор CFX96 Bio-Rad) исследовали основные группы микроорганизмов: бактерии, археи (16SpPHK), грибы (18SpPHK) в зональной дерново-глубокоподзолистой почве Ядринского района (Чувашия) и палеопочвы под археологическим памятником сареевского городища «Ножа-Вар», расположенной в 190 м от зональной. ДНК из почвенных образцов выделяли с использованием PowerSoil DNA IsolationKit MO BIO.

Погребенная почва обнаружена под насыпным оборонительным валом, который датируется ранним железным веком (2-я половина III – начало II тыс. до н.э.). Профили обеих почв имели аналогичное строение, для анализа были использованы образцы из горизонтов А (гумусово-аккумулятивный), Е (элювиальный), ВТ (текстурный).

Не смотря на то, что почвы имели схожий морфологический профиль, количество прокариотных микроорганизмов в погребенной почве в 2-2.5 раза ниже по сравнению с

зональной, грибов – на порядок ниже, что связано с ассоциацией почвенных микроорганизмов с ризосферой зоной поступления легкодоступных органических веществ, которыми бедны погребенные почвы.

Показано закономерное уменьшение количество копий рибосомальных генов бактерий вниз по профилю зональной почвы от  $2.9 \times 10^{11}$  до  $8 \times 10^{10}$ . В погребенных почвах в ряду горизонтов А-Е-ВТ такая тенденция сохраняется, хотя количество генов бактерий уменьшается в несколько раз: от  $1.2 \times 10^{11}$  до  $2.5 \times 10^{10}$ .

Количество генов архей в профилях этих почвах изменяется по-другому – достигает максимума в горизонте Е и минимума – в горизонте ВТ (от  $1.8 \times 10^{10}$  до  $8 \times 10^9$  в зональной и  $4 \times 10^9$  до  $3.5 \times 10^9$  в палеопочве). Аналогичная картина наблюдается по микроскопическим грибам – от  $3.8 \times 10^{11}$  до  $1.4 \times 10^{11}$  в зональной, от  $3.2 \times 10^{10}$  до  $1.8 \times 10^{10}$  копий в погребенной почве.

Так как палеопочвы сохранили профильное распределение микробных генов, характерное для современных аналогов, можно предположить, что генетическая информация о микробных сообществах способна сохраняться в подобных почвах длительное время и служить источником сведений об их биоразнообразии и биологической активности.

*Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 17-16-01057.*

## **Филогенетическое разнообразие и экологическая роль прокариот в экстремальных природных экосистемах Внутренней Азии**

<sup>1,2</sup> Лаврентьева Е.В., <sup>1</sup> Раднагуруева А.А., <sup>1</sup> Эрдынеева Е.Б., <sup>1</sup> Бархутова Д.Д., <sup>1</sup> Зайцева С.В.,  
<sup>3</sup> Коцюрбенко О.Р.

<sup>1</sup> ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, lena\_1@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет, Москва

Уникальной особенностью региона Внутренней Азии является широкое распространение экстремальных местообитаний, которые являются местами выживания, сохранения и активной геохимической деятельности микробных сообществ, а также резервуарами выделения экстремофилов, имеющих биотехнологический потенциал.

Цель - определить таксономическое разнообразие микробных сообществ экстремальных экосистем Внутренней Азии с помощью метода высокопроизводительного секвенирования и оценить влияние природных факторов на развитие микробного сообщества.

Впервые оценено разнообразие микробных сообществ гидротерм Байкальской рифтовой зоны, выявлены закономерности формирования разнообразия микробных матов в зависимости от экологических условий среды обитания. Установлено, что с понижением температуры происходит смена продукционного звена сообществ: хемосинтетическое термофильное сообщество (при  $65^\circ\text{C}$ ) заменяется фотосинтетическим термофильным сообществом с преобладанием аноксигенного фотосинтеза (при  $50^\circ\text{C}$ ) и фотосинтетическим умеренно термофильным/мезофильным сообществом с преобладанием оксигенного фотосинтеза (при  $40^\circ\text{C}$ ).

Впервые оценено разнообразие микробных сообществ минеральных озер пустыни Бадаин Жаран, Внутренняя Монголия (Китай). Выявлено, что в донных осадках исследованных озер развиваются специализированные алкало- и галофильные микробные сообщества. Доминирующими филумами в микробном сообществе всех озер являются *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, с отличиями на уровне классов и родов. Показано, что выявленные различия в таксономическом разнообразии микробных сообществ осадков щелочных озер обусловлены условиями среды обитания. Основными факторами, определяющими разнообразие бактерий, являются общая минерализация, рН.

*Работа поддержана проектом VI.55.1.2. (бюджетная тема ИОЭБ СО РАН) и проектом Минобрнауки РФ № 6.9754.2017.*

# Разнообразие микробных сообществ в осадках озера Байкал, характеризующихся различным составом разгружающихся флюидов

Ломакина А.В., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Захаренко А.С., Погодаева, Галачьянц Ю.П., Земская Т.И.

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, lomakina@lin.irk.ru

В донных осадках различных типов геологических структур озера Байкал охарактеризована структура микробных сообществ с использованием платформы массового параллельного секвенирования Roche 454 и реакции Сэнгера.

Установлено, что наблюдаемое разнообразие бактерий и архей сопоставимо по оценкам сложности, но характеризуется различным составом доминирующих филумов и низким представительством одинаковых филотипов бактерий и архей (Kadnikov et al., 2012, 2013; Zemskaya et al., 2015; Черницына и др., 2016; Lomakina et al., 2017). Отмечено, что состав разгружающихся флюидов оказывает влияние на разнообразие микроорганизмов, а гидраты метана (ГГ) и другие углеводородные газы являются источником углерода и энергии и определяют развитие тех или иных филумов бактерий и архей.

В районе метанового сипа Посольская Банка, где отмечен особый поток минерализованных флюидов доминировали представители  $\delta$ -*Proteobacteria*, также детектированы последовательности филумов *Deinococcus-Thermus*, *Chloroflexi* и *Acidobacteria*, филумов-кандидатов *Aminicenantes* и *Atribacteria*. В районе низко-температурного вента Фролиха, где отмечается интенсивный поток флюидов и развиваются микробные маты, функционирование которых основано на хемосинтезе и метанотрофии в бактериальном сообществе доминируют представители филумов *Cyanobacteria* и *Actinobacteria*. В районе метанового сипа Санкт-Петербург, где обнаружены микробные маты, функционирование которых основано только на метанотрофии в составе сообщества доминируют *Verrucomicrobia*,  $\beta$ - и  $\gamma$ -*Proteobacteria*.

Во всех типах геологических структур среди бактерий большую долю составляли метанотрофы, отличающиеся по структуре гена *pmoA* и формирующие отдельный кластер на филогенетическом дереве с некультивируемыми представителями из холодных экосистем (Ломакина и др., 2014; Zemskaya et al., 2015).

В исследованных районах отмечены археи филумов *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota*, участвующие в цикле азота. Последовательности *Thaumarchaeota* образуют на филогенетическом дереве два кластера, один из которых включает последовательности культивируемых *Thaumarchaeota*, окисляющих аммоний.

В подповерхностных и глубинных осадках выявлены представители архей группы ANME-2d, которые могут осуществлять анаэробное окисление метана (Haroon et al., 2013; Ding et al., 2015), их присутствие в осадках одного из районов на озере Байкал подвержено в лабораторных экспериментах.

В структуре микробных сообществ выявлены байкальские линии архей, впервые описанные Кадниковым с соавт. (2012). На основе филогенетического анализа наиболее представленные последовательности кластера Baikal-1 отнесены к филуму *Thaumarchaeota* (Group C3), кластера Baikal-2 к филуму *Crenarchaeota* (порядок *Desulfurococcales*), для которых показано участие в ферментации органического вещества до ацетата и водорода, являющиеся субстратами для метаногенных архей.

Работа выполнена при поддержке Гос. задания 0345-2016-0007.

## Микрофлора воздуха городской антропоэкосистемы

Лыков И.Н.

ФГБОУ ВО «Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского», Калуга,  
linprof47@yandex.ru

Источником микроорганизмов являются все среды и обитатели урбоэкосистемы. Чаще всего микробный пейзаж атмосферы формируется за счет деятельности человека и микроорганизмов почвы. В свою очередь микрофлора почвы урбанизированных территорий

формируется за счет опавшей листвы, бытового мусора, фекалий собак, кошек и птиц. В среднем на одного жителя небольшого российского города (например, г. Калуги) приходится до 1 кг фекалий кошек и собак в год.

Нами отмечена значительная изменчивость качественного и количественного состава бактериальной сообщества в приземной атмосфере города Калуги в зависимости от сезона года и места отбора проб. Максимальное содержание общей микрофлоры в 1 м<sup>3</sup> воздуха наблюдалось весенне-летний период во всех местах отбора проб. Но наибольшие концентрации нами зафиксированы в центре города, в промышленном районе, санитарно-защитной зоне полигона ТБО и на улицах с интенсивным автомобильным движением. В сосновом бору и на берегу реки Оки общее содержание микроорганизмов в воздухе было минимальным во все сезоны года.

Состав бактериальных сообществ, обнаруженных в пробах воздуха зимой, характеризуется примерно одинаковым соотношением кокков, бацилл и плесневых грибов. В весенние месяцы чаще всего высевались кокки и плесневые грибы. Летняя атмосфера отличалась обилием бацилл, а осенняя – повышенными концентрациями плесневых грибов. Среди всех микроорганизмов воздуха превалировала грамположительная флора.

В общей массе кокковой микрофлоры приземной атмосферы города нами идентифицированы микрококки (до 42%), тетракокки (до 29%), стафилококки (до 10%), диплококки (до 7%), сарцины (до 22%) и стрептококки (до 7%). Наибольшее количество микрококков высевалось в зимние и осенние месяцы (рис. 3). Среди плесневых грибов чаще высевались плесневые грибы родов *Cladosporium* (до 44%), *Penicillium* (до 31%) и *Aspergillus* (до 33 %). Далее в убывающем порядке следуют *Alternaria* и *Fusarium* (до 9%), *Botrytis* (до 6%). Род *Cladosporium* превалировал в общей массе плесневых грибов во все сезоны года, но максимальное количество спор высевалось в весенне-летний период, т.е. в период вегетации растений. Пенициллы и аспергиллы присутствовали в воздухе почти равномерно в течение всего года. Остальные микромицеты (*Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*) также равномерно высевались из воздуха в течение года, но в значительно меньших количествах (рис. 4).

Нами отмечен высокий процент обнаружения микрококков и спор грибов рода *Cladosporium* в различных районах города. Это может быть связано с загрязнением территории города фекалиями собак и кошек, содержащих споры грибов рода *Cladosporium*. В 1 г. фекалий собаки содержится до 23 млн. различных микроорганизмов, которые могут серьезно влиять на здоровье людей, вызывая среди прочих аллергические реакции. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять важность загрязнения почвы животными в антропоэкологии, как одного из основных источников загрязнения приземной атмосферы. Миграция микроорганизмов из почвы в атмосферу является показателем санитарного состояния городской среды и фактором риска для здоровья населения.

## **Разнообразие фильтрующихся форм прокариот в почве и почвенных конкрециях**

*Лысак Л.В., Соина В.С., Лапыгина Е.В., Кудинова А.Г.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения,  
Москва, lvlysak@mail.ru

Применение электронно-микроскопических методов исследования выявило присутствие в природных средах мелких форм бактерий, размеры которых приближаются к «запрещенному объему» (сфере диаметром 200 нм). Такие бактерии описываются отечественными и зарубежными авторами как фильтрующиеся формы прокариот (ФФП, бактерий, архей), ультрамикробактерии, наноформы бактерий.

Численность, разнообразие и функции ФФП в почвах практически не исследованы. Целью нашей работы были оценка численности, физиологического состояния, таксономического и морфологического разнообразия ФФП в почвах.

Определение численности, физиологического состояния ФФП, полученных методом фильтрации почвенной суспензии через ядерные мембранные фильтры, показало, что численность их весьма велика и составляет от десятков до сотен миллионов клеток в 1 г почвы, содержание их по отношению к общему числу бактериальных клеток в почве варьирует от 3 до 15%.

В загрязненных городских почвах Московского региона численность и доля ФФП бактерий выше, чем в ненарушенных почвах той же природной зоны (400-600 млн.), а доля доходит до 15%, выше, чем в природных незагрязненных почвах. В экстремально холодных местообитаниях (примитивные почвы Антарктиды) при низкой общей численности бактерий доля их была еще выше и достигала 70-80%. В почвенном профиле выявлен локус (карбонатные новообразования и железистые конкреции), где значительная часть клеток бактерий представлена ФФП (до 40 %). Численность их составляла 400 – 600 млн. клеток в 1 г почвы. Изучение жизнеспособности ФФП (краситель LIVE/DEAD, L7012) свидетельствуют об их высокой жизнеспособности.

При помощи метода FISH (fluorescence in situ hybridization) показано, что среди ФФП обнаруживаются те же крупные филумы бактерий (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, и *Proteobacteria*), что и среди клеток более крупного размера, что подтверждает ранее высказывавшееся предположение, что в условиях лимитированного роста может происходить измельчением клеток бактерий.

Изучение ФФП с помощью сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии выявило присутствие среди них делящихся клеток, что также свидетельствует в пользу их жизнеспособности. Клетки ФФП были довольно разнообразны по морфологии и представляли собой как клетки грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. ФФП из железистых конкреций напоминали по морфологии микоплазмы и были покрыты минеральными слоями.

Полученные данные свидетельствуют о широком распространении ФФП в почвах и почвенных конкрециях. По морфоцитологическим признакам они представляют собой как активные, так и покоящиеся формы. Высокая доля ФФП в конкрециях, а также их активное физиологическое состояние, позволяет предположить значимую роль бактерий в процессах биоминерализации. Образование ФФП в почве, видимо, один из механизмов сохранения жизнеспособности в неблагоприятных условиях среды.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФ №14-50-00029.*

## **Дрожжи в микобиоте виноградников Дагестана**

*Магомедова Е.С., Абдуллабекова Д.А., Аливердиева Д.А.*

ФГБУН Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН

Проведено многолетнее изучение видового разнообразия и численности дрожжевых грибов, обитающих на различных субстратах виноградников Дагестана. При исследовании применяли современные подходы, позволяющие получать данные как для мониторинга, так и для видовой ревизии, вызванной изменением границ этой группы грибов и переходом от фенотипической систематики к филогенетической. Работы проводили как в период зрелости винограда, так и в годовой динамике, применяя вертикально-ярусный подход, предполагающий одновременный отбор проб различных типов субстратов виноградников – части виноградного растения, опавших листьев в различной степени разложения, почвы. Видовую идентификацию изолятов осуществляли методом анализа нуклеотидных последовательностей рДНК.

В результате исследований выявлено, что на виноградниках формируется специфический дрожжевой комплекс, включающий 43 вида, в котором доминируют аскомицеты - 38 видов, относящиеся к 20 родам. Базидиомицеты представлены 5 видами, принадлежащим к 3 родам. Группировки дрожжей по субстратам различались как видовым составом, так и численностью. Наиболее разнообразный состав характерен для ягод – 30 видов, меньше -20 и 15 видов, соответственно, обнаружено в почве и на других частях растения. Показано, что формирующееся на виноградниках сообщество дрожжевых грибов, включает ресурсные виды, в том числе *Saccharomyces cerevisiae*, представляющий интерес для пищевой биотехнологии. Проведен отбор штаммов, потенциально-перспективных для бродильных производств.

Выявлен характер изменчивости видового состава дрожжевых грибов для разных типов субстратов, отмечена их постепенная миграция с растения в почву, которая участвуя в сохранении и распространении многих видов, является важным элементом «круговорота дрожжей».

Показано, что численность дрожжевых грибов на виноградниках существенно меняется в зависимости от субстрата и времени года, при этом, самые высокие значения характерны для

опада, самые низкие для почвы - средние значения составляли, Ig (КОЕ/г) – 3,43 и 2,59, соответственно.

Сравнительный анализ видового состава дрожжей виноградников Дагестана с данными по их встречаемости на виноградниках 18-ти европейских, азиатских и южноамериканских стран выявил достаточно высокий уровень схожести, что на наш взгляд указывает на сильное влияние схожих климатических параметров мест произрастания винограда, а также особенностей самого растения. Выделена группа часто выделяемых видов, представляющих наиболее типичное сообщество дрожжевых грибов, ассоциированных с виноградом: *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida zemplinina*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia terricola*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida stellata*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Cryptococcus magnus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia membranifaciens*, *Torulaspora delbrueckii* и *Sporidiobolus metaroseus*.

Таким образом, исследование дрожжей виноградников Дагестана, проведенное с позиций вертикально-ярусного подхода, при использовании молекулярно-биологических методов анализа, позволило получить сведения об их численности и видовом разнообразии, что способствует выявлению принципов организации микроорганизмов в природе.

## **АТСС – мировая коллекция штаммов, клеточных линий и других биоресурсов для контроля качества и научных исследований**

*Марек Примик*

LGC STANDARDS, Санкт-Петербург, ru@lgcstandards.com

Референс-штаммы и клеточные линии АТСС принадлежат к наиболее часто приводимым в нормах и справочниках, а также в работах, публикуемых в известных научных журналах. Доклад состоит из двух частей. Первая часть посвящена референс-штаммам АТСС, с особым акцентом на штаммы для контроля качества в микробиологических лабораториях фармпредприятий. Будут обсуждены многоэтапный контроль качества штаммов в коллекции АТСС, отличия между штаммами из разных источников, а также рекомендации по числу пассажей и хранению штаммов. Во второй части доклада будет рассказано о коллекции клеточной биологии АТСС. Неправильная идентификация клеточных линий, перекрестное загрязнение и использование культур высокого пассажа способствуют получению неверных результатов. АТСС проводит всестороннюю аутентификацию и контроль качества клеточных линий имеющихся в своей коллекции. Коллекция клеточной биологии АТСС включает не только традиционные постоянные клеточные линии человека и животных, но и новейшие ресурсы для эффективной работы в области клеточных технологий.

## **Грибы приземных слоев воздуха (численность, динамика, разнообразие)**

Марфенина О.Е., Колосова Е.Д.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, ivanovaane@gmail.com, kolosovaktrn@gmail.com

При изучении биоаэрозолей воздуха важно изучение общей численности грибных диаспор, содержания живых и мертвых пропагул, сезонной и суточной динамики, влияния метеопараметров, путей очистки воздуха от грибных диаспор. Отбор проб воздуха вели импактором ПУ-1Б у поверхности почвы и высоте 1,5м ежемесячно в 2014-2016гг. на площадках с разным растительным покровом в г.Москве. Определяли состав культивируемых грибов методом посева и численность люминесцентной микроскопией.

Максимальная численность культивируемых грибов в приземных слоях воздуха составляла до  $660 \pm 1250$  КОЕ/м<sup>3</sup> и всегда была наибольшей в летне-осенний период. При учете люминесцентной микроскопией уровень содержания грибных диаспор составлял сотни тысяч грибных диаспор в м<sup>3</sup>. Наибольшие значения числа грибов отмечены в летне-осенний период до  $165 \cdot 10^3 \pm 19 \cdot 10^3$ , а минимальное -  $(47 \cdot 10^3 \pm 15 \cdot 10^3$  спор/м<sup>3</sup>) зимой. Состав культивируемых

грибов в приземном воздухе преимущественно представлен видами родов *Alternaria*, *Cladosporium*, а также *Botrytis cinerea*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Paecilomyces* sp., *Arthrinum phaeospermum*, *Beauveria bassiana*, *Sporothrix* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Stachybotrys chartarum*, *Epicoccum nigrum*, *Acremonium strictum*, *Verticillium* sp., *Botryotrichum piluliferum*, *Arthrotrichum conoides*, *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp.

В летне-осенний период в воздухе происходило накопление спор крупных фракций (до 20 мкм). Это связано с развитием в это время на поверхности растений темноокрашенных грибов. В зимний период среди грибного аэропланктона преобладают споры мелких размеров.

Очищение воздуха от грибных диаспор происходит при седиментации пропагул и вымывании с осадками. Наибольшие значения для седиментации спор имели показатели ветропереноса. Отчетливые различия в седиментации спор отмечались в суточной динамике. До трех раз более активное оседание спор из воздуха происходило ночью. Выпадение осадков снижает (в 1,5-2,5 раза) в течении 1,5-2 часов число диаспор в приземном воздухе. При выпадении снега также происходит очищение приземного воздуха от грибных диаспор.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-02036.*

## **Особенности структуры и разнообразия микробных матов меромиктического содового озера Доронинское (Забайкалье)**

*Матюгина Е.Б.<sup>1</sup>, Белькова Н.Л.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, Чита, [evgenia48@mail.ru](mailto:evgenia48@mail.ru)

<sup>2</sup> Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, [nibelkova@gmail.com](mailto:nibelkova@gmail.com)

Микробные маты являются активными компонентами экстремальных экосистем. В микробных сообществах фотической прибрежной и влажной песчаной береговой зон меромиктического содового озера Доронинское клонированием ампликонов 16S рДНК с последующим секвенированием по Сэнгеру детектированы представители 6 фил эубактерий, филы архей, а также неидентифицированные фототрофные эукариоты. Доминирующими в исследованных сообществах являлись Proteobacteria (34-70 %) и Actinobacteria (18-33%). Кислородные фотосинтезирующие цианобактерии составили невысокую долю в сообществе до 10 % и были представлены *Synechococcus* sp. и неидентифицированными видами. Доминирующими классами филы Proteobacteria являлись Alpha-, Gamma- и Epsilonproteobacteria. Класс Epsilonproteobacteria представлен единственным хемолитоавтотрофным микроорганизмом *Sulfurimonas autotrophica* продуцирующим органическое вещество за счет окисления серы и ее восстановленных соединений. Gammaproteobacteria показали высокое разнообразие видов и характеризовались разнообразными типами метаболизма (от гетеротрофии до нитрат- и металлредукции) и с невысокой долей каждого вида в сообществе. Alphaproteobacteria представлены хемолитогетеротрофным аэробным аноксигенным фототрофом - *Roseinatronobacter monicus* и бактериями, осуществляющими анаэробное дыхание с использованием нитратов - *Paracoccus* sp. Среди Actinobacteria интерес представляли Candidatus Limnoluna rubra, для которых известно наличие генов альтернативного актинородопсинового фотосинтеза. Бактерии филумов Firmicutes, Bacteroidetes и Spirochaetes составляли невысокую долю в сообществах до 10 % и представлены разнообразными хемоорганогетеротрофными микроорганизмами, осуществляющими гетеротрофную деструкцию серосодержащих органических веществ. Отсутствие абсолютного (до 95 %) доминирования какой-либо одной группы микроорганизмов, вероятно, свидетельствует о хорошо сбалансированном сообществе. При этом в микробных сообществах альго- и цианобактериальных матов, где продуцирование органического вещества осуществлялось кислородными фотосинтезирующими и хемолитогетеротрофными микроорганизмами установлено наибольшее количество филогенетически и функционально разнообразных групп. В экосистемах, где продуцентами являлись только хемолитоавтотрофные микроорганизмы, сообщество представлено ограниченным количеством видов.

# Генетически дивергентные внутривидовые популяции дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* в статусе разновидностей: геномика, экология и биогеография

Наумов Г.И., Боровкова А.Н., Лютова Л.В., Наумова Е.С.

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, gnaumov@yahoo.com

Сообщение посвящено успехам и перспективам изучения внутривидовых дивергентных популяций дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, их молекулярным, физиологическим и экологическим особенностям. Данные генетического и молекулярных анализов однозначно продемонстрировали дискретность видов обоих родов, другими словами, отсутствие континуума между видами. Роды *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* представлены биологическими видами, имеющими постзиготическую изоляцию: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzvi*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* и *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. wickerhamii* (Naumov et al. 2000, 2010, Kurtzman et al. 2011). Виды в пределах рода, обладающего общей системой типов спаривания, способны скрещиваться в любой комбинации, но их гибриды стерильны с нежизнеспособными продуктами мейоза – аскоспорами.

У дрожжей *S. bayanus*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* обнаружены генетически дивергентные популяции в статусе таксономических разновидностей, имеющих частичную постзиготическую изоляцию, но регулярную мейотическую рекомбинацию родительских маркеров (Наумов 1999, 2000, 2017; Наумов и др. 2006). В частности, недавно описанный таксономический вид *S. eubayanus* Samraio et al., как и *S. bayanus* var. *ivarum*, является разновидностью *S. bayanus* (Наумов 2017). У видов *K. lactis* и *K. marxianus* также найдены генетически маркированные популяции, соответственно, «drosophilorum», «krassilnikovii», «lactis», «phaseolosporus», «pseudovanudenii», «vanudenii», «водная», «новая» (Kurtzman et al. 2011; Naumov & Naumova 2002; Naumov et al. 2004) и «cicerisporus», «fragilis», «marxianus», «wikenii» (Наумов 2006; Наумов и др. 2010). Их статус до конца еще не определен, по крайней мере, некоторые из них уже могут быть классифицированы как таксономические разновидности.

Изучение дивергентных внутривидовых популяций позволяет привлечь новый генофонд для фундаментальных и прикладных исследований биотехнологически важных дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*.

## Численность копий генов грибов и ферментативная активность микромицетов почв Антарктиды

Никитин Д.А.<sup>1,2</sup>, Марфенина О.Е.<sup>2</sup>, Бирюков М.В.<sup>2</sup>, Железова А.Д.<sup>1,2</sup>, Тхакахова А.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, dimnik90@mail.ru

До 85% биосферы постоянно находится при температурах  $\leq +5^{\circ}\text{C}$ . Большинство микроорганизмов адаптировано к ним. Но физиология часто перспективных в биотехнологии психрофильных микромицетов чрезвычайно холодных биотопов Антарктиды плохо изучена. Цель работы - оценка численности копий гена 18S рРНК грибов и ферментативной активности микромицетов из Антарктиды.

Почвы отобраны к.г.н. Мергеловым Н.С. и к.г.н. Лупачёвым А.В. в ходе 55–58-й Российской Антарктической экспедициях у станций «Прогресс» (образцы 70 и 71) под мхом *Bryum pseudotriquetrum* и «Русская» (профиль LA55-RS-05 – реголиты с альго-бактериальными матами; профиль LA55-RS-01 – сухие почвы под лишайниками). Чистые культуры выделены методом посева на агаризованные среды при  $+5^{\circ}\text{C}$  и  $+25^{\circ}\text{C}$ .

Численность копий гена 18S рРНК грибов в почве под лишайниками и каменной мостовой уменьшалась с глубиной. В почве с лишайниками – быстрее [от  $27 \cdot 10^8$  (на 1-5см) до  $5 \cdot 10^8$  копий гена 18S рРНК (на 5-17см)], а в каменной мостовой – медленнее [от  $30 \cdot 10^8$  (на 2-7см) до  $23 \cdot 10^8$  копий гена 18S рРНК (глубже 31см)]. Обратная тенденция зафиксирована в



профиле подо мхом: этот показатель увеличился от поверхностного горизонта к подповерхностным [от  $4 \cdot 10^8$  (на 0-1см) до  $12 \cdot 10^8$  копий гена 18S рРНК (на 2-3см)].

Максимальная активность гидролиза флуоресцеина диацетата (ФДА) (интенсивность работы эстераз, липаз и протеиназ) отмечена для типичных антарктических видов – *Hyphozyma variabilis* (51 нмоль ФДА/г мицелия\*час) и *Thelebolus ellipsoideus* (29 нмоль ФДА/г мицелия\*час). Целлюлолитическая активность видов, типичных для Антарктиды: *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Thelebolus microsporus* и *Phoma violacea* была ниже (от 24 до 40 мкмоль глюкозы/г биомассы), чем для эвритопных видов (до 90 мкмоль глюкозы/г биомассы). Однако активность целлюлаз у всех штаммов максимальна при +5°C. Ни у одного из проанализированных 10 антарктических штаммов не была обнаружена даже малая активность лакказ и фенолоксидаз.

*Работа проводилась при поддержке гранта Российского научного фонда №14-50-00029.*

## **Сезонная динамика микробной биомассы в почве на разных глубинах**

*Никитин Д.А.<sup>1,2</sup>, Чернов Т.И.<sup>1</sup>, Железова А.Д.<sup>1,2</sup>, Тхакахова А.К.<sup>1</sup>, Бгажба Н.А.<sup>1,2</sup>, Семенов М.В.<sup>1</sup>, Кутюва О.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, dimnik90@mail.ru

Известно, что почва – крупнейший депозитарий микроорганизмов в природе. В тоже время, сезонная динамика их биомассы изучена недостаточно. А основная часть статей по этому вопросу посвящена исследованию исключительно поверхностного почвенного слоя. Цель работы - анализ уровня бактериальной и грибной биомассы в верхнем (до 10см) и нижних (35 и 55см) слоях дерново-подзолистой почвы Московской обл. в течении вегетационного сезона. Исследование проводили с помощью люминесцентной микроскопии (красители: акридиновый оранжевый, калькофлюор белый).

Наибольшая биомасса (сотые доли мг/г почвы - бактерии и десятые доли мг/г почвы - грибы) микроорганизмов, вне зависимости от сезона, характерна для поверхностного богатого органическими веществами горизонта, а наименьшая (тысячные доли мг/г почвы - бактерии и десятые доли мг/г почвы - грибы) – для глубинного. Относительно большая длина актиномицетного мицелия (до 20 м) на протяжении всего периода наблюдений зафиксирована только в слое 10 см. Грибной мицелий имел максимальную длину (десятки и сотни метров на грамм почвы) в поверхностных слоях – 10 и 35 см.

Показана связь уровня микробной биомассы с динамикой по сезонам таких параметров как влажность, температура, состояние растительности. Наибольшие колебания в биомассе бактерий и грибов происходили в верхних горизонтах до глубины в 35 см. Минимальные изменения биомассы микроорганизмов отмечали в глубинном горизонте (55 см). Полагаем, что эта зависимость связана с одной стороны с меньшим влиянием корневых экссудатов на жизнедеятельность микроорганизмов минеральных слоев, а с другой стороны – с меньшими изменениями температуры и влажности в течение года на значительной глубине.

*Работа проведена при поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 17-16-01057.*

## **Численность грибов и ферментативная активность микромицетов почв Антарктиды**

*Никитин Д.А.<sup>1,2</sup>, Марфенина О.Е.<sup>1</sup>, Бирюков М.В.<sup>1</sup>, Железова А.Д.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева, dimnik90@mail.ru

Изучение распространения и свойств микроорганизмов экстремальных местообитаний – актуальное направление современной микробиологии. Цель работы - оценка распределения численности грибов в профилях почв разных биотопов Антарктиды и определение ферментативной активности штаммов антарктических микромицетов. Исследовали более богатую органическим веществом почву подо мхом *Bryum pseudotriquetrum* и бедные почвы

под «каменной мостовой»; и под лишайниками. Определение численности грибов вели классическими и молекулярными методами. Культивируемые микромицеты учитывали на средах Чапека, глюкозопептонный агар, сусло-агар.

В почвах под лишайниками и «каменной мостовой» число грибов составляло  $10^3$  КОЕ/г и уменьшалось вниз по профилям на порядок. Подо мхами наибольшая численность отмечена не в поверхностном, а в нижележащем горизонте ( $8.9 \cdot 10^4$  КОЕ/г); глубже численность пропагул уменьшалась.

Общую численность грибов и оценивали по количеству копий гена 18S рРНК. В почве под лишайниками и «каменной мостовой» она уменьшалась по профилю. В первой от  $27 \cdot 10^8$  (глубина 1-5см) до  $5 \cdot 10^8$  копий гена 18S рРНК (5-17см), а во второй от  $30 \cdot 10^8$  (глубина 2-7см) до  $23 \cdot 10^8$  копий гена 18S рРНК (до 31см)]. Напротив, в профиле подо мхом число копий гена увеличивалось от верхнего горизонта  $4 \cdot 10^8$  (0-1см) к нижележащему -  $12 \cdot 10^8$  (2-3см). То есть оценка распределения численности грибов обоими методами показывает сходные тенденции.

Максимальная активность гидролиза ФДА отмечена для типичных антарктических видов – *Hyphozyma variabilis* (51 нмоль ФДА/г мицелия\*час) и *Thelebolus ellipsoideus* (29 нмоль ФДА/г мицелия\*час). Целлюлолитическая активность видов, типичных для Антарктиды – *Antarctomyces psychrotrophicus*, *Thelebolus microsporus* и *Phoma violacea* была ниже (от 24 - 40 мкмоль глюкозы/г), чем у выделенных эвритопных видов (до 90 мкмоль глюкозы/г). Активность целлюлаз изолятов выше при  $+5^\circ\text{C}$ , чем при  $+25^\circ\text{C}$ . Ни у одного из изолятов не выявлена лакказная и фенолоксидазная активность.

*Работа проведена при поддержке гранта РФФИ №14-50-00029.*

## **Эпидемиологически опасная микрофлора, выделяемая от птиц**

*Новикова О. Б.*

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства – филиал  
ФНЦ «ВНИТИП» РАН

Бактериальные болезни - проблема не только ветеринарная, но и медико-экологическая, так как имеется широкий спектр микроорганизмов, персистирующих в организме кур в основном в кишечнике, не вызывающих клинического заболевания их, но эпидемиологически опасных. Промышленное птицеводство – ведущий производитель высококачественной диетической продукции. При нарушении санитарных правил получения птицеводческой продукции происходит её контаминация, что может в конечном итоге привести к заболеванию людей, и особенно детей. Птицы могут быть носителями многих зоопатогенных микроорганизмов, вызывающих острые кишечные инфекции (ОКИ) у людей, таких как *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Особое внимание должно быть обращено на то, что сельскохозяйственные птицы могут являться носителями эпидемиологически опасной кишечной микрофлоры, ведущие представители которой *Salmonella enteritidis* и *Campylobacter jejuni* – возбудители сальмонеллёза и кампилобактериоза.

Птица (куры, утки, гуси, индейки, цесарки), производимая в частных хозяйствах, на птицефабриках и малых предприятиях, может быть обсеменена микроорганизмами как прижизненно — в период выращивания и во время транспортирования, так и в процессе убоя. В процессе потрошения основная контаминация (БГКП, *Proteus*, *Salmonella*, *Cl.perfringens*) происходит при разрывах кишечника, желчного пузыря, яичных фолликулов. По статистике *Clostridium perfringens* входит в «тройку лидеров» (после сальмонелл и кампилобактерий) среди причин пищевых токсикоинфекций людей во всем мире.

Нами при изучении спектра микрофлоры, выделяемой от птиц разных видов, при исследовании трупов, помёта, мазков из трахеи выявлено более 20 видов микроорганизмов, доминирующими из которых являются *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*. Спектр и процентное соотношение микроорганизмов был различен в зависимости от возраста и технологии выращивания птиц. Присутствие данных зоопатогенных микроорганизмов в кишечнике птиц увеличивает риск обсеменения ими тушек при убое. В связи с этим нами было проведено бактериальное исследование проб воды из ванн охлаждения и смывов с тушек кур в убойных цехах на разных этапах убоя, в том числе и на выходе готовой продукции. В

результате исследований были выделены различные микроорганизмы, в т.ч. *Campylobacter jejuni* и *Salmonella enteritidis*.

Для профилактики бактериальных болезней птиц нами разработана система контроля, включающая 11 главных положений: диагностический мониторинг; микробиологический мониторинг вывода и выращивания цыплят; эпизоотологический мониторинг; контроль с использованием антибактериальных препаратов; применение альтернативных антибиотикам препаратов; патогенетическая терапия; применение про- и пребиотиков; дезинфекция; дератизация; специфическая профилактика; точки критического контроля анализа опасности (НАССР). Предлагаемая нами система контроля обеспечивает своевременную диагностику и проведение необходимого комплекса противоэпизоотических мероприятий как в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры, так и в отношении эпидемиологически опасной.

## **Роль бактериальных гликозил-гидролаз во взаимодействии фитопатогенных пектобактерий с растениями**

Нуриахметова Ч.Б.<sup>1</sup>, Ковтунов Е.А.<sup>2</sup>, Даминова А.Г.<sup>2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1,2</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет.

<sup>2</sup>ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань,  
ch\_nuriakhmetova@mail.ru

Пектобактерии относятся к одним из самых вредоносных фитопатогенов, вызывающих у растений картофеля заболевание «черная ножка» в полевых условиях и мягкую гниль клубней картофеля при хранении. При взаимодействии с растением-хозяином пектобактерии используют «грубую силу», продуцируя комплекс ферментов, разрушающих различные компоненты растительной клеточной стенки.

В результате проведенного транскриптомного анализа нами определено, что у *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*), находящихся в растении, активируется экспрессия генов, кодирующих факторы вирулентности, в том числе ферменты, разрушающие полисахариды растительной клеточной стенки. Для выяснения возможной роли некоторых из этих ферментов во взаимодействии пектобактерий с растениями, нами были получены и проанализированы штаммы *Pba*, мутантные по генам, аннотированным как рамногалактуронил гидролаза (ЕСА3749) и  $\beta$ -1,4-эндогалактаназа (ЕСА0852).

Ферменты, кодируемые данными генами, могут катализировать модификацию рамногалактуронана I – одного из пектиновых веществ растительной клеточной стенки. Нами было показано, что этот полимер (и/или высокомолекулярные продукты его распада) необходим для формирования бактериальных эмболов – «многоклеточных» структур, формируемых *Pba* в сосудах ксилемы. В связи с этим, важную информацию о формировании системы паразит/хозяин могут предоставить данные о роли ферментов *Pba*, модифицирующих этот полимер и потенциально изменяющих его физико-химические свойства.

Анализ на вирулентность проводили, используя заражение клубней картофеля пектобактериями с последующим взвешиванием мацерированных тканей. Инактивация ЕСА3749 и ЕСА0852 приводила к снижению патогенных свойств бактерий. Вес мацерированной ткани был достоверно меньше в клубнях, инокулированных мутантными формами. Таким образом, как рамногалактуронил гидролаза, так и  $\beta$ -1,4-эндогалактаназа вносят вклад в процесс развития «мокрой гнили» клубней картофеля.

*Исследование поддержано грантом РФФ №15-14-10022.*

## **Социальная организация микроорганизмов и взаимодействия в системе микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов**

Олескин А. В., Водолазов И. Р.

Кафедра общей экологии, Биологический факультет Московского государственного университета им. В.Ломоносова

Микроорганизмы вступают в гамму социальных форм поведения, включая коллективную агрессию, изоляцию, кооперацию, аффилиацию (взаимное притяжение). Они формируют биосоциальные системы, опирающиеся на различные механизмы координации поведения индивидуальных клеток, в том числе: (1) иерархию с лидерским поведением отдельных клеток; (2) сетевые структуры из клеток со многими частичными лидерами. В докладе рассмотрен один из типов коммуникационных агентов, участвующих в формировании микробных биосоциальных систем и их взаимодействии с организмом-хозяином в случае симбиотической микробиоты. Речь идет об эволюционно-консервативных соединениях, играющих роль нейротрансмиттеров и нейрогормонов в организме животных и человека. На примере трех групп низкомолекулярных медиаторов (летучие жирные кислоты, биогенные амины и аминокислоты) авторы предлагают рассматривать подобные химические факторы в качестве универсального нейромедиаторного «языка», определяющего взаимодействие микробиоты, иммунной системы хозяина, а также его центральной и периферической нервной системы. На базе собственных и литературных данных демонстрируется, что (1) микроорганизмы-симбионты человека способны продуцировать нейроактивные соединения и (2) микробиота специфически реагирует на «хозяйские» нейромедиаторы. В этой связи обосновывается необходимость критического переосмысления стратегий использования пробиотиков и их метаболитов в терапии и профилактике заболеваний, связанных с дисбиотическими нарушениями, с учетом того, что пробиотические микроорганизмы способны продуцировать медиаторы, модифицирующие функционирование микроэкологической, иммунной и нервной систем человеческого организма.

### **Микроценозы клоновых культур морских токсичных динофлагеллят**

*Орлова Т.Ю., Каменева П.А., Беленева И.А., Ефимова К.А., Карпенко А.А., Зинов А.А.*

Национальный научный центр морской биологии ДВО РАН, Владивосток, torlova06@mail.ru

В настоящее время отсутствуют детальные описания симбиотических сообществ динофлагеллят, а их роль в функционировании морских микроценозов остается существенно недооцененной. Мы представляем результаты изучения микроценозов культур потенциально токсичных динофлагеллят родов *Ostreopsis* и *Prorocentrum* из коллекции «Морской биобанк» ННЦМБ ДВО РАН. Комплексное исследование динофлагеллят, их экзо- и эндосимбионтов проведено с применением широкого спектра микроскопических, ультраструктурных, микробиологических, хемотаксономических, молекулярно-генетических и биохимических методов. Оценены динамические изменения в структуре микроценозов в условиях накопительной культуры. Получены первые данные по использованию специфических и универсальных молекулярно-генетических маркеров к 16S рДНК, 23S рДНК и к некоторым генам поликетидсинтаз (PKS) для определения симбиотического состава культивируемых и некультивируемых микроорганизмов, ассоциированных с культурами морских динофлагеллят *Ostreopsis* sp. ORUS и *Prorocentrum foraminosum* PrRUS. Исследованы жирнокислотный состав липидов и пигменты динофлагеллят и бактерий-ассоциантов. Изучена динамика накопления токсинов группы омега-3 кислоты на разных стадиях роста культур *P. foraminosum* и оценено возможное влияние бактериального симбиотического сообщества на продукцию и накопление токсина DTX-1. Представлены данные об «аккумулятивных тельцах», обнаруженные в клетках *Ostreopsis* sp., которые, предположительно, являются эндосимбионтами динофлагеллят.

*Исследования микроценозов клоновых культур морских динофлагеллят поддержаны проектами РФФИ 17-04-01394 и "Дальний Восток" № гос. регистрации АААА-А16-116101110103-8; № гос. регистрации АААА-А16-116101110095-6, и № гос. регистрации АААА-А16-116101110096-3.*

### **Микроорганизмы озера Байкал: от психрофильных углеводородокисляющих аэробов до термофильных миксотрофов**

*Павлова О.Н., Букин С.В., Горшков А.Г., Ханаева Т.А., Земская Т.И.*

ФГБУН Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск, pavlova@lin.irk.ru

Озеро Байкал является общепризнанной природной лабораторией для изучения биологического разнообразия, в том числе прокариот. Экологические условия оз. Байкал позволяют выделять микроорганизмы с различным типом метаболизма для дальнейшего использования в биотехнологических целях. Наличие в озере подводных грязевых вулканов, разгрузок нефте- и газонасыщенных флюидов, залежей газовых гидратов приводят к формированию микробных сообществ, обладающих широкими адаптационными способностями, обеспечивающими деструкцию различных соединений, а также обуславливают вероятность попадания в холодные поверхностные осадки глубинных термофильных прокариот. С помощью серии экспериментов в термобарических условиях (80°C, 5 МПа) установлено, что достаточно длительное культивирование микроорганизмов донных осадков из приразломной области метановых сипов, обогащённых биомассой *Synedra acus* приводит к деструкции диатомей с образованием биомаркеров нефти, таких как ретен, либо гаммацерен. Дальнейшее культивирование позволило получить в чистой культуре термофильные (оптимум роста 65–70°C) микроорганизмы, отнесенные к р. *Thermaerobacter* и р. *Geobacillus*. Байкальский представитель р. *Thermaerobacter*, в отличие от известных видов этого рода – миксотроф, обладает способностью роста за счёт окисления водорода. В то время как представитель р. *Geobacillus* образует общую кладу с некультивируемыми формами и не образует её с другими кластерами культивируемых форм внутри рода *Geobacillus*. Основываясь на молекулярных данных и значительных отличиях физиолого-биохимических свойств от типовых видов, микроорганизмы могут быть отнесены к новым видам.

В результате направленного скрининга, в чистую культуру получены аэробные деструкторы нефти, обладающие алкангидроксилазами и образующие биосурфактанты. На рост и развитие углеводородокисляющих микроорганизмов положительно влияет добавление в экспериментальные среды элементов минерального питания ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). В процессе культивирования ассоциации байкальских микроорганизмов выявлено ускорение процесса биodeградации алкановой фракции нефти при содержании в среде NaCl в диапазоне от 7.0 до 15 г/л (степень конверсии до 95%). Для штаммов р. *Pseudomonas* и р. *Bacillus* оценена ферментативная активность в процессе биodeградации фенантрена, флуорантена, пирена. Показано, что степень конверсии ПАУ может достигать 30–40%.

*Работа выполнена в рамках государственного задания по теме 0345–2016–0007, гранта РФФИ № 16-04-00181\_a и Интеграционного проекта 4.1.2 ИИЦ СО РАН.*

## **Микробные сообщества лишайников субарктической зоны России: структура и особенности локализации**

*Панкратов Т.А., Качалкин А.В.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет почвоведения,  
Москва, tpankratov@mail.ru; kachalkin\_a@mail.ru

Лишайники арктической и субарктической зон России, как показали предварительные исследования, являются обособленным биобанком разнообразия прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Их численность в талломах большинства кустистых и листоватых лишайников сопоставима с численностью в почвах и ризосфере. Лишайники – это симбиозы, роль бактерий и дрожжей в которых пока остаётся неясной. Основной вопрос – существуют ли облигатные группы бактерий в талломах лишайников и какова их специфичность и специализация, а также какова основная роль дрожжевого населения лишайников.

Методами FISH и культивированием на питательных средах были определены доминирующие группы бактерий и виды дрожжевых грибов в 7 видах лишайников, отобранных на полуострове Киндо, а также в Хибинах (Кольский п-ов): *Cladonia stellaris*, *C. arbuscula*, *C. rangiferina*, *C. portentosa*, *C. uncialis*, *Nephroma arcticum*, *Alectoria ochroleuca*.

По результатам FISH-анализа доминирующими бактериальными группами оказались Proteobacteria и Actinobacteria, в числе которых наиболее значительное место занимали представители подкласса Alphaproteobacteria (до 60% от общей численности идентифицированных групп). Метод посева на комплексные питательные среды подтвердил доминирование Proteobacteria. В посевах лидирующая роль принадлежала представителям

родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter*, *Ewingella*, *Bradyrhizobium*, *Duganella*, *Janthinobacterium*, *Aquaspirillum*. Обнаружена значительная вариабельность численности бактерий класса Acidobacteria в зависимости от вида и зоны таллома, а основными культивируемыми его представителями оказались бактерии рода *Terriglobus* и штаммы, филогенетически близкие к *Acidobacterium capsulatum* (96%). При анализе численности и таксономической структуры бактерий, локализованных в растущих и разлагающихся частях таллома было обнаружено увеличение доли инвазивных гидролитиков (группа Bacteroidetes и мицелиальные Actinobacteria) в стареющем талломе (с 10 до 15-20%) при сохранении численности Alphaproteobacteria.

Предложены критерии для оценки факультативности и облигатности бактериального населения лишайников на основе коэффициента вариации, полученного при сравнении долей участия таксономических групп бактерий в растущей, стареющей и разлагающейся частях таллома.

Дрожжевое население лишайников, в отличие от почв и растений, преимущественно состояло из аскомицетовых видов дрожжей, среди которых доминировал вид *Candida sphagnicola* и анаморфные дрожжевые формы рода *Dothiora*. Наибольшая численность и разнообразие дрожжей обнаружены в ростовой зоне талломов. Полученные результаты показывают, что дрожжевые грибы самых разных таксономических и экологических групп являются обязательным компонентом лишайнобиоты, однако в лишайниковой дернине северотаёжных лесов создаются условия для сохранения и развития специфичных дрожжевых сообществ, которые значительно отличаются от типичных дрожжевых комплексов филлосферы растений, а также почв.

## Почвенный микробиом – уникальный природный ресурс России

*Першина Е.В., Андронов Е.Е.*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», Санкт-Петербург, [pershina.elizaveta@yandex.ru](mailto:pershina.elizaveta@yandex.ru)

Главным прорывом в современной микробиологии стала возможность исследовать микробные сообщества во всем их природном многообразии. Благодаря быстрому развитию технологий высокопроизводительного секвенирования появилась возможность работать с большими объемами генетической информации и перейти к изучению разнообразия ранее неизвестных форм микроорганизмов. Но, что более важно, метагеномные технологии позволили перейти на новый системный уровень исследования биоразнообразия. Объектом исследования стал совокупный генетический материал экосистемы, в котором содержится информация не только об «актуальных» видах и биологических процессах, но и о «генетическом прошлом» экосистемы (известно, что в природных средах находится достаточно много «реликтовой» ДНК). Таким образом, почвенный метагеном содержит информацию не только о составе микробного сообщества, но и о регуляторных механизмах, поддерживающих его целостность и функциональную активность как единой, непрерывно эволюционирующей природной системы.

Современная наука еще далека от полной «расшифровки» метагеномной информации. Причиной этому является большой объем данных (размер почвенного метагенома может превышать  $10^{15}$ – $10^{16}$  нуклеотидов), а также их сложная структура (необходимость одновременного анализа тысяч молекул ДНК, источники которых зачастую неизвестны). Несмотря на имеющиеся сложности, исследование почвенного метагенома набирает обороты, создаются научные школы и крупные международные проекты. В России метагеномное направление развивается очень активно, ввиду традиционного приоритета в исследовании почв, обусловленного их колоссальным разнообразием и сельскохозяйственным значением. В предлагаемом докладе на основе научного материала, накопленного в ходе совместных исследований ФБГНУ ВНИИСХМ и Почвенного института им. В.В. Докучаева, будут обобщены и систематизированы современные представления о структуре почвенного метагенома, о принципах его географической, пространственной и временной организации. Будет обобщен многолетний опыт работы с метагеномными данными, начиная от сбора

почвенного материала и заканчивая биоинформационным анализом и интерпретацией полученных результатов. В заключение доклада будут предложены возможные перспективы и пути для дальнейшего успешного развития почвенной метагеномики в России.

*Работа поддержана грантом РФФ 14-26-00094.*

## **Изучение структуры биоПАВ, синтезируемых микроорганизмами, выделенными из поверхностных вод и седиментов 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. Скрыбина РАН, Пущино,  
phdvetrova@gmail.com

Микроорганизмы способны к синтезу биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ, или биосурфактанты), относящихся к разнообразным поверхностно-активным соединениям. Причем микроорганизмы-продуценты, являющиеся представителями достаточно далёких таксономических групп, могут синтезировать близкие типы биоПАВ, и наоборот, в пределах одного и того же рода могут встречаться различные типы продуцируемых ПАВ. При росте микроорганизмов на гидрофобных органических соединениях (ГОС), таких как алканы, моно- и полиароматические углеводороды, жиры и масла и т.д. чаще всего наблюдается образование биоПАВ. Особое внимание исследователей уделяется фундаментальным закономерностям путей биосинтеза ПАВ и катаболизма ГОС бактериями, что возможно использовать, например, для повышения эффективности технологий биоремедиации нефтезагрязненной окружающей среды. Выделенные в работе штаммы были проанализированы на способность к образованию биологических поверхностно-активных соединений. Наиболее объективным параметром, свидетельствующим о наличии в растворе поверхностно-активных соединений, является поверхностное натяжение, которое является строгой количественной оценкой свойств среды. В результате, из 178 протестированных микроорганизмов 12 штаммов продемонстрировали высокую поверхностную активность (поверхностное натяжение ниже 40 мН/м). Для определения структуры продуцируемых биоПАВ проводилась наработка культуральной жидкости с последующей экстракцией липосодержащих компонентов. Экстракты анализировали тонкослойной хроматографией с двумя качественными реакциями на углеводы и на аминокислотные группы. Структурный анализ липидных экстрактов штаммов проводили с помощью масс-спектрометрии в условиях регистрации положительных и отрицательных ионов. Для дальнейшего анализа были выбраны экстракты штаммов рода *Rhodococcus* 66s и 74w, обладавшие наиболее интенсивным окрашиванием на углеводы и на аминокислотные группы. Было показано образование нового липопептидного биоПАВ, продуцируемого представителем рода *Rhodococcus*.

*Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ, уникальный идентификатор – RFMEFI61615X0038.*

## **Микробиология мелководных метановых сипов Черного моря**

*Пименов Н.В.<sup>1</sup>, Канапацкий Т.А.<sup>1</sup>, Малахова Т.В.<sup>2</sup>, Тарновецкий И.Ю.<sup>2</sup>, Меркель А.Ю.<sup>1</sup>, Гулин М.Б.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва,  
npimenov@fbras.ru

<sup>2</sup>Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН, Севастополь,  
m\_gulin@mail.ru

Северо-западный шельф Черного моря характеризуется широким распространением струйных газовыделений метана, по геологической классификации относящихся к холодным метановым сипам, которые встречаются на самых разных глубинах от нескольких метров до 500 м и более и оказывают заметное влияние на биогеохимические процессы в этом регионе. В 1989 г. в прибрежной зоне г. Севастополя были обнаружены акустические аномалии, идентифицированные как струйные газовыделения из морского дна. Позднее в Севастопольской морской акватории было зарегистрировано несколько десятков площадок газовых факелов,

которые располагались как вдоль линий геодинамических нарушений, так и вне их. Наши микробиологические и биогеохимические исследования площадок струйных газовыделений в бухтах Ласпи, Херсонесская и Казачья позволили выявить несколько типов струйных газовыделений. Первый тип, наблюдаемый в бухте Ласпи, по-видимому, связан с разгрузкой по разломам глубинного термогенного метана ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$  - -33,34‰). В песчаных отложениях рядом с выходом метана в аэробных условиях наблюдались повышенные скорости процесса окисления метана, но отсутствовали какие-либо признаки развития бактериальных матов. Второй тип струйный газовыделений, обнаруженный в Херсонесской бухте, сопровождался формированием в зонах газовых высачиваний характерных бактериальных матов, основу которых составляли спирохетообразные нитчатые организмы, типа микробного сообщества «Thiodendron». Изотопный состав метана здесь оказался существенно легче (-60,4‰), что указывает на значительную долю современного микробного метана в составе пузырькового газа, разгружающегося в этой бухте. И, наконец, третий тип метановых газовыделений – сипы бухты Казачьей, активность которых, по-видимому, напрямую зависит от современных микробных процессов деструкции органического вещества с выделением метана и сероводорода. В этой сильно загрязненной бухте с ограниченным водообменом в хорошо прогретых водах к середине лета происходит массовое отмирание и разложение водорослей, сопровождающееся образованием в анаэробной зоне осадочных отложений большого количества биогенных газов – метана и сероводорода, избыток которых поступает в водную толщу в виде пузырьковых высачиваний.

Заметный интерес представляют также метановые газовыделения, обнаруженные в Каламитском заливе вблизи побережья полуострова Тарханкут, акватория которого достаточно хорошо защищена от антропогенного воздействия. Наши исследования скоростей микробных процессов в сочетании с выявлением основных групп микроорганизмов методом высокопроизводительного секвенирования свидетельствуют о развитии в зонах загрузки таких сипов сбалансированного микробных сообщества, активно вовлекающего метан и сероводород в биогеохимические круговороты.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-04-00023.*

## **Разнообразие прокариотических и эукариотических микроорганизмов в соленых и солоноватых водоемах Южного Урала на основе высокопроизводительного метагеномного секвенирования**

*Плотников А.О., Селиванова Е.А., Пошвина Д.В., Хлопко Ю.А., Черкасов С.В.*

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург,  
protoz@mail.ru

Соленые и солоноватые водоемы широко распространены на разных континентах, однако их микробное разнообразие изучено намного слабее по сравнению с пресноводными и морскими сайтами. В связи с этим целью исследования была оценка разнообразия про- и эукариот в континентальных солоноватых и соленых водоемах, расположенных на Южном Урале. Для этого был использован современный метод высокопроизводительного секвенирования фрагментов 16S и 18S генов, предоставляющий уникальную возможность оценивать с высокой точностью генетическое разнообразие сообществ про- и эукариот в разных водоемах.

Исследованы Соль-Илецкие озера в Оренбургской области, оз. Эльтон и впадающие в него соленые реки в Волгоградской области, а также солоноватые и соленые озера Челябинской области. Секвенирование 16S и 18S ДНК-библиотек проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Данные по составу сообществ обрабатывали комплексом биоинформатических программ.

Установлено, что богатство прокариот на высоком таксономическом уровне (филумы и классы) закономерно убывало по мере нарастания уровня минерализации, тогда как на уровне родов подобная зависимость не прослеживалась. По данным кластерного анализа сравниваемые образцы сформировали три группы в соответствии с уровнем минерализации: 10-49, 85-150 и 170-330 г/л. Доминирующие комплексы прокариот в гипергалинных озерах с уровнем минерализации выше 180 г/л включали археи *Halonotius* sp., *Halorubrum* sp. и



*Halohasta* sp., наногалоархеи, а также археи сем. *Haloferacaceae* и бактерии *Salinibacter* sp., *Psychroflexus* sp., *Halomonas* sp. Доминирующий комплекс озер с минерализацией 110-180 г/л включал бактерии *Roseovarius* sp., *Spiribacter* sp., *Marinobacter* sp. и *Puniceicoccus* sp., сем. *Microbacteriaceae* и *Ectothiorhodospiraceae*, археи сем. *Haloferacaceae*.

В озерах с минерализацией 10-49 г/л преобладали бактерии *Gamma*proteobacteria, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, сем. *Rhodobacteraceae*, "*Pelagibacter*" sp., *Rhodoluna* sp., *Flavobacterium* sp., *Thalassolituus* sp. Обнаруженные различия в составе прокариот в исследованных водоемах коррелируют не только с уровнем минерализации, но и составом солей, а также географической локализацией.

Доминирующие по численности протисты в изученных водоемах принадлежали таксономическим супергруппам *Archaeplastida*, *Stramenopiles*, *Rhizaria* и *Opisthokonta*. Доминантные виды и роды были специфичны для каждого водоема, но их богатство снижалось по мере возрастания минерализации. Доля специфических для каждого водоема видов (71.5 – 83.6%) была намного выше, чем общих видов (16.4 - 28.5%). Кластерный анализ сгруппировал сообщества протистов со схожей минерализацией биотопа и географической локализацией.

Установлена высокая доля уникальных сиквенсов про- и эукариот, не имеющих аналогов с высоким уровнем сходства в базе данных GENBANK, что говорит о наличии большого количества новых таксонов в изученных водоемах.

*Работа выполнена на базе ЦКП ИКВС УрО РАН «Персистенция микроорганизмов» при финансовой поддержке РФФИ (17-04-02079, 17-04-00135).*

## **Биологическая активность почвы при обработках гербицидами сорной растительности в питомниках декоративных культур**

*Н.Н. Полякова<sup>1</sup>, О.Д. Сидоренко<sup>2</sup>, О.О. Белошапкина<sup>1,2</sup> Л.Г. Серая<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Моск. обл., р.п. Большие Вяземы, 79268108650@yandex.ru

<sup>2</sup>Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва

На изменение численности и активности почвенных микроорганизмов оказывают влияние различные факторы, одним из которых являются гербициды. В практике городского и частного озеленения, а также в производственном цикле питомников использование гербицидов для контроля травянистой сорной растительности является стандартным приемом. При этом периодически происходит негативное воздействие этих препаратов на выращиваемые древесные растения.

В рамках комплексных исследований по изучению последствий обработок гербицидами травянистой сорной растительности на рост и развитие саженцев липы мелколистной, выращиваемых во Владимирской области в питомнике «Мамина дача» в 2015-2017 г., изучали микробиологическую активность почвенных микроорганизмов в их корнеобитаемом слое. Использовали общедоступный и чувствительный метод льянных полотен, почва дерново-подзолистая, хорошо оструктуренная.

Варианты опыта: нативная дернина, Раундап, ВР, Дикамин-Д, ВР, Банвел, ВР, Линтур, ВДГ, Логран ВДГ, Лонтрел-300, ВР в дозах, рекомендованных производителями за неделю по посадке липы, контроль – без весенней предпосадочной обработки гербицидами.

После обработки Линтуром разложение ткани через 60 дней было минимальным. Максимальная степень разложения льяного полотна отмечена после обработки Ураганом Фортэ и была сопоставима с нативной дерниной. Несколько меньше степень разложения льяного полотна была в контрольном варианте и после обработки дикамином. В остальных вариантах была примерно одинаковая тенденция к снижению микробиологической активности относительно контроля. По-видимому, эти препараты слабо разлагались в почве и оказывали минимальное воздействие на почвообитающие грибы и бактерии.

## **Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий подпорядка *Micrococcineae*: структурное разнообразие, таксономические и экологические аспекты**

Потехина Н.В.<sup>1</sup>, Стрешинская Г.М.<sup>1</sup>, Тульская Е.М.<sup>1</sup>, Евтушенко Л.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, potekhina56@mail.ru

<sup>2</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

Изучение гликополимеров клеточных стенок бактерий расширяет представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов, представляет интерес в связи с рядом вопросов экологии и таксономии прокариот, пониманием механизмов взаимодействия бактерий в микробных сообществах и с макроорганизмами, выяснением особенностей симбиотических взаимоотношений, патогенности, адаптации бактерий к физико-химическим условиям мест обитания, в т.ч., экстремальным.

В клеточных стенках ряда корине- и нокардиоформных актинобактерий подпорядка *Micrococcineae* (порядок *Actinomycetales*, класс *Actinobacteria*), у которых в ходе ранних исследований не были найдены тейхоевые кислоты, характерные для «высших актиномицетов» (образующих мицелий и сложные репродуктивные структуры), выявлены бесфосфатные гликополимеры различных классов. Среди обнаруженных гликополимеров – тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты, нейтральные и кислые полисахариды, в том числе, уникальные. Полимеры каждого класса разнообразны по составу и строению основной цепи, наличию и природе боковых заместителей (остатки сахаров, органических и неорганических кислот), положению гликозидных связей, конфигурации гликозидных центров и т. д. Гликополимеры, обычно не более трех, присутствуют в клеточной стенке в различных сочетаниях.

В фокусе настоящего сообщения – особенности состава и строения гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов известных и вновь выявленных видов родов *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Rathayibacter*, *Promicromonospora* (ряд видов являются фитопатогенами или галофилами). Обсуждаются структурные особенности выявленных полимеров, характерные для бактерий упомянутых родов. Приводятся сведения о том, что типовые штаммы видов, в том числе, филогенетически близких (более 99% сходства генов 16S рРНК) и сходных по традиционным фенотипическим признакам, дифференцируются по составу и строению гликополимеров клеточной стенки и их структурным компонентам.

Результаты исследований показали перспективность изучения гликополимеров клеточных стенок актинобактерий различных родов и семейств подпорядка *Micrococcineae*, не исследованных в этом отношении ранее, как с точки зрения выявления новых природных биополимеров с уникальными свойствами, так и в связи с вопросами таксономии и экологии этой обширной группы бактерий.

## **Микробная активность и разнообразие прокариот в кислых горячих источниках кальдеры Узон**

Прокофьева М.И.<sup>1</sup>, Русанов И.И., Пименов Н.В., Меркель А.Ю., Равин Н.В.,  
Бонч-Осмоловская Е.А.

Федеральный Исследовательский Центр Фундаментальных Основ Биотехнологии РАН,  
Москва, <sup>1</sup>prokofeva@gmail.com

Микробные сообщества горячих кислых источников кальдеры Узон (Камчатка) были исследованы радиоизотопными и молекулярными методами. Исследования были проведены в пяти источниках с температурами 58-90 °С и рН 3.0 – 4.1.

Процессы ассимиляции углерода, метаногенеза, ацетогенеза, а также утилизации органических веществ изучали путем инкубации проб в присутствии меченых субстратов. Меченые по углероду-14 субстраты (NaHCO<sub>3</sub>, равномерно меченая Д-глюкоза, уксуснокислый

Na) добавляли к пробам воды и осадка и инкубировали в месте отбора пробы или в источниках со схожей температурой.

Активность автотрофных микроорганизмов, детектированную через процесс ассимиляции углерода была наиболее активной при температуре около 60 °С, особенно в источнике 1880 с Центрального поля. В двух источниках Оранжевого поля с температурой 81-84 °С шел процесс полной деструкции глюкозы, при этом включение метки из глюкозы в биомассу не наблюдали. При температурах около 60 °С использование глюкозы не было зафиксировано. Потребление ацетата наблюдали в источниках Оранжевого поля, в источнике с Центрального поля деструкция ацетата отсутствовала, было лишь незначительное включение метки из ацетата в биомассу.

Для описания микробного сообщества трех источников осуществляли амплификацию участков V3-V4 генов 16S рРНК и составление библиотек.

В источниках 1805 (рН 3.7, T =60° С, Eh -115) и 1810 (рН 4.1, T =83-90° С, Eh -240) археи составляют чуть более половины микробного сообщества. Доминирующей группой архей микробных сообществ в обоих источниках являются кренархеоты порядка *Sulfolobales* (примерно 50 %). Также в обоих источниках встречаются представители порядков *Acidilobales*, *Thermoproteales* и различные «некультивируемые» линии кренархеот. Эвриархеоты составляли незначительную долю сообщества и были представлены порядками *Thermoplasmatales* и *Halobacteriales*. Наиболее интересным результатом является идентификация в источниках 1805 и 1810 наноархей, составлявших, соответственно, 5% и 24% от всех архей.

Микробное сообщество источника 1880 (рН 3.0, T =58 - 65 °С, Eh +50) состоит практически полностью из архей (около 95%). При этом среди архей наибольшую часть (60 %) занимают представители некультивируемых представителей порядка *Thermoplasmatales* (кластеры A10 и BSLdp215), группа Terrestrial Hot Spring Group (из *Aigarchaeota*) занимает 27% архей, 8% занимают представители рода *Caldisphaera* и 1% - представители *Nanoarchaeota*.

Наибольшую долю среди бактерий в источниках с температурой около 60 °С составляли представители типа *Aquificae* относящиеся к роду *Hydrogenobaculum*, отсутствующие в высокотемпературном источнике. Кроме того, в источнике с Центрального поля обнаруживали *Mesoaciditoga* и *Desulfurella*, а в источниках с Оранжевого поля присутствуют различные группы бактерий, не описанных как гипертермофилы, вероятно попадающие в источники из окружающих низкотемпературных районов.

Таким образом, наши данные показывают лидирующую роль культивируемых и некультивируемых архей в активных процессах продукции и деструкции органического вещества в термоацидофильных микробных сообществах.

## **Гены нерибосомальных пептидаз и поликетидсинтаз стрептомицетов, выделенных из озера Байкал**

*Протасов Е.С., Аксенов-Грибанов Д.В., Войцеховская И.В., Тимофеев М.А.*

ФГБУ высшего образования «Иркутский государственный университет», Иркутск,  
protasov.evgenii@gmail.com

Гены нерибосомальных пептидаз (NRPS) и поликетидсинтаз (PKS), участвующие в синтезе вторичных метаболитов, были обнаружены у актинобактерий, выделенных из грунтов озера Байкал. Выделенные штаммы относятся к роду *Streptomyces*. Гены вторичного метаболизма были амплифицированы с помощью следующих праймеров - KSMA-F 5'-TS GCS ATG GAC CCS CAG CAG-3' и KSMB-R 5'-CC SGT SCC GTG SGC CTC SAC- 3' (PKS I), K1 5'TSAAGTCSAACATCGG BCA3' и M6R 5'CGCAGGTTSCSGTACCAGTA3' (PKS I), PKS II-FW 5'-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3' и PKS II-RV 5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3' (PKS II), A3F 5'GCSTACSYSATSTACACSTCSGG3' и A7R 5'SASGT CVCCSGTSCGGTAS3' (NRPS). Была проведена экстракция биологически активных веществ из супернатанта, полученного при культивировании штаммов на среде M1. Полученные экстракты были протестированы против ряда микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

Из 20 штаммов стрептомицетов все показали наличие KS домена PKS 1-го типа и 15 штаммов дали ПЦР-продукт для метил-малонил-СоА-трансферазы также PKS 1-го типа.

Однако для PKS 2-го типа было показано наличие только 2 штаммов, IB2016P328-4 и IB2016P334-2, с подходящим размеров ПЦР-продукта. Продукт для домена аденилирования NRPS был найден у всех штаммов кроме IB2016P331-1. Таким образом, все штаммы обладают хотя бы двумя генами вторичного метаболизма, а большинство тремя (80%). Штамм IB2016P328-4 содержит все четыре исследованных гена вторичного метаболизма.

Антибиотические тесты выявили наличие активности против *S. aureus* у семи штаммов и 11 штаммов активных против *C. albicans*. Активности против *P. aeruginosa* не наблюдали. Некоторые штаммы показали активность как против грамположительного *S. aureus*, так и *C. albicans* – IB2016P328-4, IB2016P330-3, IB2016P333-2, IB2016P333-3. Последние три штамма показали наличие трех из четырех исследованных генов вторичного метаболизма.

Таким образом байкальские актинобактерии, в частности стрептомицеты, обладают разнообразными генами вторичного метаболизма, что может являться свидетельством в пользу их возможного использования для синтеза новых биологически активных веществ.

Настоящее исследование проведено при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ (16-34-00686), грант Минобрнауки РФ Госзадание 6.9654.2017/8.9. и гранта ИГУ для молодых ученых и аспирантов.

## **Коллекция культур базидиомицетов LE-BIN: проблемы сохранения и перспективы использования штаммов**

*Псурцева Н.В.*

ФГБУН Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург,  
nadyapsu@binran.ru

В последние годы биоресурсные коллекции стали, наконец, рассматривать как важный компонент научной инфраструктуры, способствующий повышению эффективности научных исследований и разработок, и проблема сохранения биоресурсных коллекций приобрела новый виток развития. Инвентаризация российских коллекций, выявление состояния их фондов и финансовая поддержка реально существующих коллекций имеет большое государственное значение. Одной из старейших в России живых коллекций высших грибов является специализированная Коллекция культур базидиомицетов (LE-BIN), созданная в БИН РАН в конце 1950-х годов для изучения биологически активных веществ макромицетов. В середине 1990-х коллекция подключилась к решению проблемы сохранения биоразнообразия посредством выделения в культуру и сохранения *ex situ* широкого видового и штаммового разнообразия базидиомицетов, с акцентом на редкие, малоизученные и ресурсные виды. За 60 лет был пройден значительный путь становления и развития. В настоящее время это крупнейший в России фонд с широким видовым разнообразием и множеством уникальных штаммов, сохраняемых исключительно в этой коллекции. В настоящее время в LE-BIN сохраняется около 3000 штаммов более 600 видов из 190 родов, 51 семейства и 8 порядков, что составляет примерно десятую часть природного видового разнообразия базидиальных грибов России. Коллекция неуклонно развивается за счет пополнения культурами, полученными в результате ежегодных полевых работ. За последние 5 лет в ней было депонировано 919 новых штаммов макромицетов из различных регионов России, среди которых редкие, эктомикоризные и биотехнологически значимые виды.

Современные требования к поддержанию коллекций микроорганизмов предполагают несколько способов параллельного хранения. В коллекции LE-BIN штаммы сохраняют методом суб-культуры (5 °C), под водой (5 °C), и при глубокой заморозке (-80 °C). Однако существуют проблемы выживаемости ряда базидиомицетов при стандартных методах хранения. Так, эктомикоризные грибы, как правило, не выживают при криоконсервации, а некоторые тропические виды – при хранении в холодильнике. Для штаммов таких видов требуется отработка индивидуальных условий хранения.

Коллекция культур базидиомицетов служит основой для проведения фундаментальных и прикладных разработок, базой для подготовки научных кадров, обучения студентов и проведения работы с населением, она является основным хранилищем *ex situ* природного генетического разнообразия высших грибов России.

## Микробные процессы циклов углерода и серы в пресноводном мероклиматическом озере Светлое (Архангельская область)

А.С. Саввичев<sup>1</sup>, Н.М. Кокрятская<sup>2</sup>, И.И. Русанов<sup>1</sup>, О.Н. Лунина<sup>1</sup>, Б.Б. Кузнецов<sup>1</sup>,  
В.М. Горленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва, savvichev@mail.ru

<sup>2</sup> Институт экологических проблем Севера УрО РАН, г. Архангельск

<sup>3</sup> Институт Биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, г. Москва

Проведены биогеохимические, изотопно-геохимические и микробиологические исследования пресноводного меромиктического оз. Светлое, принадлежащего к бассейну Белого моря. В придонном слое озера обнаружено значительное количество солей железа (до 240 мкМ), марганца (до 60 мкМ), сульфида (2 мкМ), а также метана (30 мМ). Максимум численности микроорганизмов приходился на зону хемоклина (ред-окс зону) в интервале глубин 23-24,5 м. По результатам клонирования ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК в воде хемоклина (металимниона) оз Светлое выявлено значительное разнообразие фило типов протеобактерий, относящихся к альфа-, бета-, гамма- и дельта- Proteobacteria, Chlorobi, Cyanobacteria, Bacteroides и Actinobacteria. Пик окислительного фотосинтеза находился в зоне концентрации цианобактерий филогенетически близких к *Synechococcus rubescens*. В исследованном образце обнаружены аэробные хемоавтотрофные бактерии *Sulfuritalea hydrogenivorans*, что указывает на активность сероокисляющих бактерий в хемоавтотрофной продукции. В деструкционных процессах преобладал метаногенез, тогда как бактериальная сульфатредукция в водной массе была невысокой, с максимумом непосредственно под зоной хемоклина. Радиоизотопным методом зарегистрировано окисление метана, как в аэробной зоне, так и в бескислородных слоях монимолимниона. Предполагается участие закисного железа в анаэробном окислении метана. В хемоклине обнаружено большое количество психрофильных видов метанотрофных бактерий рода *Methylobacter* и метилотрофных бактерий рода *Methylotenera*. Микроскопический контроль воды с глубин 23 и 24 метров показал скопления мелких клеток, окруженных оксидами железа и марганца. В концентрации оксидов металлов принимали участие мелкие фикоэритрин-содержащие цианобактерии рода *Synechococcus*, а также, фототрофные бактерии филума Chlorobi, присутствующие в меньшем количестве. Микроскопический контроль показал, что меньшая роль в окислении солей закисного железа принадлежит аэробным железобактериям морфотипа “Siderocapsa”.

## Микроорганизмы–деструкторы ПАУ, колонизирующие листовые пластинки древесных растений урбанизированных территорий

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

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
sazonova\_oi@rambler.ru

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) – распространенные и устойчивые загрязнители окружающей среды, обладающие мутагенными и канцерогенными свойствами. Большинство ПАУ попадают с выбросами сначала в атмосферу, а уже затем оседают на твердой поверхности. Полная деградация или частичная трансформация ПАУ микробными сообществами филлосферы препятствует рециркуляции ПАУ в природе. Целью исследования была идентификация микроорганизмов-деструкторов ПАУ, колонизирующих филлосферу, а именно листовые пластинки, древесных растений урбанизированных зон.

С листовых пластинок трех видов городских древесных растений (липы, клена и ясеня) методами прямого посева и накопительных культур на минеральной среде выделено 180 штаммов-деструкторов фенантрена, нафталина и салицилата. Геномный фингерпринт (REP-PCR) позволил установить, что микробиота листовых пластинок разных видов древесных растений уникальна, их филлосферный микробный профиль не совпадает, несмотря на близость произрастания.

С использованием системы MALDI Biotyper показано, что при высевах из накопительных культур на агаризованной среде с салицилатом преобладают представители *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria*. В отличие от штаммов-деструкторов салицилата, на агаризованной среде с фенантроном выявлены преимущественно *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* и, в меньшей степени, *Gammaproteobacteria*. Штаммы-деструкторы нафталина методом накопительного культивирования не были выделены. Прямым высевам на агаризованную минеральную среду с фенантроном и нафталином показано преобладание представителей *Actinobacteria*. На среде с салицилатом – представителей гифомицетов (*Aureobasidium*).

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) ПЦР-продуктов, полученных со специфичными олигонуклеотидными праймерами к варибельному участку гена 16S РНК, позволил установить, что в процессе накопительного культивирования на фенантроне и салицилате формируются микробные консорциумы, состав которых со временем меняется. Анализ мажорных полос в ДГГЭ показал, что в накопительной культуре на салицилате преобладают представители *Gammaproteobacteria*. Накопительные культуры на фенантроне, по сравнению с салицилатом, показывают большее разнообразие эпифитной микрофлоры, способной к катаболизму ПАУ. В соответствующих образцах присутствуют представители *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*-) и *Bacteroidetes*.

## Оценка действия детонационных наноалмазов на почвенные бактерии

Сафронова Н.А.<sup>1,2</sup>, Кокшарова О.А.<sup>1,3</sup>, Хмель И.А.<sup>3</sup>, Куликова Н.А.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва

<sup>3</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Москва

<sup>4</sup>Институт биохимии РАН им. А.Н. Баха, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»  
РАН, Москва, safronova.nina2007@mail.ru

Нынешний XXI век отличается масштабным применением различных наноматериалов. Наноалмазы детонационного синтеза (НА) впервые были синтезированы в СССР в 1962 г. Широкомасштабное их применение на постсоветском пространстве, а затем и в мире началось с 80-х гг. прошлого столетия. Благодаря уникальным физико-химическим свойствам и размерам, НА используются в различных отраслях промышленности в качестве добавок в полимерные композиции (резины, каучуки, пленочные покрытия), микроабразивные и полировальные составы, смазки и смазочно-охлаждающие жидкости. Несмотря на широкий масштаб и длительность их применения, поведение НА в природных средах не изучено. Остается неясным их влияние на микроорганизмы, в том числе на почвенные бактерии.

Цель данной работы – оценить влияние НА на жизнеспособность ряда почвенных бактерий чашечным методом Коха. Тест-объектами являлись грамотрицательные (*Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*) и грамположительные (*Rhodococcus sp.*, *Bacillus subtilis*) бактерии. Бактериальные культуры инкубировали в жидкой среде М9 в течение 2 ч в присутствии НА (ООО «Реал-Дзержинск», РФ) в концентрациях 0,5; 1; 5; 10 мг/мл (контроль – дистиллированная вода), после чего десятикратные разведения бактериальных суспензий высевали на среду LA, инкубировали при 37°C в течение ночи и затем подсчитывались выросшие колонии. Было обнаружено, что уже минимальная концентрация НА снижает на 50% выживаемость грамотрицательных бактерий, в то время как грамположительные бактерии остаются устойчивыми к действию всех использованных в эксперименте концентраций НА. Таким образом, строение клеточной стенки может играть определяющую роль в устойчивости бактерий к действию НА.

## Микромицеты – продуценты лакказ в почвах зонального ряда и поиск штаммов, способных к деструкции гуминовых веществ

Семенова Т.А.<sup>1</sup>, Лисова З.А.<sup>2</sup>, Лисов А.В.<sup>2</sup>, Заварзина А.Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова, Москва

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микробиологии им. Г.К.Скрябина, Пущино

<sup>3</sup>Факультет почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, zavarzina@mail.ru.

Гуминовые вещества составляют 60-80% почвенного органического вещества, процессы их образования и деструкции во многом определяют глобальный баланс углерода и климат. Микроскопические грибы – дейтеромицеты и аскомицеты, являются важнейшими компонентами почвенного микробного комплекса, однако их роль в трансформации ароматических соединений гумуса изучена слабо. Роль лакказ микромицетов в деструкции гуминовых веществ не установлена. Цель работы состояла в определении численности и видового состава микромицетов – продуцентов лакказ в зональном ряду почв, выявлении штаммов, способных к деструкции гуминовых веществ на агаризованных средах и в погруженных культурах.

Микромицеты – продуценты лакказ выделяли из образцов подзола, дерново-подзолистой, серой лесной почвы и чернозема типичного путем посева на агаризованную среду Чапека, содержащую 250 мг/л АБТС в качестве субстрата лакказ. Для дерново-подзолистой почвы и подзола изучены сезонная динамика состава и численности микромицетов. Учет колоний проводили стандартными микологическими методами, видовую идентификацию проводили по общепринятым определителям и молекулярными методами. Способность к деградации гуминовых кислот изучали путем посева на среды, содержащие 0,5 г/л гуминовой кислоты дерново-подзолистой почвы.

Как общая численность микромицетов, так и доля продуцентов лакказ снижалась вниз по профилю почв и коррелировала с содержанием углерода. Численность штаммов-продуцентов фенолоксидаз (КОЕ/г почвы) составляла 10-50% от общей численности выделенных грибов и зависела от сезона и глубины взятия образца. Наибольшая численность микромицетов наблюдалась в верхнем слое почв до глубины 10 см. В дерново-подзолистой почве и подзоле численность продуцентов фенолоксидаз и их видовое разнообразие были выше весной, чем осенью. Среди микромицетов – продуцентов фенолоксидаз в кислых почвах наиболее часто встречались представители родов *Penicillium* (*P.janczewskii*, *P.janthinellum*, *P.waksmanii*), *Trichoderma* (*T.polysporum*, *T.koningii*, *T.viride*, *T.hamatum*) и *Phialophora* (*Ph.fastigiata*, *Ph.richardsiae*). Фенолоксидазной активностью обладали также представители рр. *Cladosporium*, *Oidiodendron*, *Acremonium*, *Monocillium*, *Sporotrichum*, *Aureobasidium*, *Verticillium*, *Monodictis*, *Chlamidosporium* и др. Способностью к обесцвечиванию гуминовых кислот на агаризованных средах обладали *Mortierella ramanniana*, *Penicillium waksmanii*, *Monodictys levis*. Проводится работа по выявлению видов, продуцирующих лакказу в погруженной культуре и способных к обесцвечиванию гуминовых кислот.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-14-01207.

## Таксономическая структура микробных сообществ серой лесной почвы склонового ландшафта

Семенов М.В.

Почвенный институт им. В.В.Докучаева, Москва, gosmv@rambler.ru

Положение в мезорельефе является комплексным биогеохимическим фактором, определяющим гидротермические условия почвы и видовое разнообразие растительного покрова. Формирующиеся на разных элементах рельефа почвы существенно отличаются по своим физико-химическим и биологическим свойствам, что приводит к формированию специфических для этих почв микробных сообществ.

Целью данной работы являлось определение структуры микробных сообществ трех почв катены, соответствующих разным участкам склона.

Объектом исследования являлся склон правой части бассейна реки Любожиха (правый приток реки Ока), расположенный в окрестностях г. Пущино Московской области. В пределах трансекты длиной 960 м были выбраны участки, соответствующие автономной, транзитной и аккумулятивной позициям склона. Автономный и транзитный участки представлены серой лесной почвой залежной и лесной экосистем, а аккумулятивная – интразональной аллювиально-луговой почвой лугово-болотной экосистемы. Образцы почв отбирались на трех глубинах (0-20 см, 20-40 см и 40-60 см).

Для определения структуры микробных сообществ проводилось секвенирование ампликонов 16S рРНК на базе MiSeq Illumina. Количественная оценка генов 16S проводилась методом количественной ПЦР. Численность метаболически активных клеток архей и бактерий определялась методом FISH.

*Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria* являлись преобладающими филумами (суммарно более 80% от микробиома) в автономном участке склона, а *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* и *Acidobacteria* (до 71%) – в транзитном. В обоих участках доминирующим видом являлся *Chthoniobacter flavus* (до 21%). В почве аккумулятивного участка выявлено доминирование филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria* (более 70%). В аккумулятивном участке наиболее представленными видами являлись бациллы *B. longiquaesitum* и *B. nealsonii*. Для всех образцов было определено соотношение бактерии:археи. Всего в почве аккумулятивного участка детектировано 22 вида метаногенов, среди которых доминировали *Methanlobus taylori*, *Methanococcoides methylutens* и *Methanosaeta concilii*. Также данное сообщество было представлено широким спектром бактерий, участвующих в циклах железа и серы. Среди метанотрофов преобладали представители класса  $\alpha$ -*Proteobacteria* *Methylosinus pucelana* и *Methylosinus acidophilus*.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, проект № 17-16-01057.

## **Влияние возрастающих концентраций синтетических поверхностно-активных веществ на развитие цианобактерии *Nostoc paludosum***

<sup>1</sup>Симакова В.С., <sup>1,2</sup>Домрачева Л.И.

<sup>1</sup>Вятская государственная сельскохозяйственная академия, vasilina.simakova.1989@mail.ru

<sup>2</sup>Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ, dli-alga@mail.ru

Синтетические поверхностно-активные вещества (СПАВ) – широко распространенная группа загрязнителей окружающей среды. К числу таких соединений, в частности, относится препарат Концентрат, активной используемый в качестве автошампуня при мойке автотранспорта. Определение степени его токсичности было проведено с использованием в качестве тест-организма цианобактерии (ЦБ) *Nostoc paludosum* Kütz №18 из коллекции фототрофных микроорганизмов кафедры биологии растений, селекции и семеноводства, микробиологии Вятской ГСХА. С помощью данного штамма ЦБ неоднократно тестировали токсичность таких соединений, циркулирующих в окружающей среде, как тяжелые металлы, пестициды, фторорганические соединения, продукты распада химического оружия и другие вещества антропогенного происхождения.

Силу угнетающего действия СПАВ Концентрат определяли по изменению дегидрогеназной активности жидкой культуры *N. paludosum* при использовании тетразольно-топографического метода, основанного на вычислении соотношения живых клеток с кристаллами формазана и нежизнеспособных (без формазана), а также при количественном спектрофотометрическом методе определения формазана. При этом выявлены тождественные реакции ЦБ на действие испытуемого поллютанта. Кроме того, испытывали действие Концентрата, внесенного в стерильную почву, на численность интродуцированной в эту почвы популяции *N. paludosum*. В обоих случаях использовали дозы Концентрата, применяемые на практике для мойки автомобилей.

Было установлено, что при действии Концентрата на *N. paludosum* число живых клеток в популяции ЦБ снижается с 97,1% в контроле до 28,2% в опытном варианте (тетразольно-



топографический метод), а количество формазана в клетках данного штамма снижается со 140,1 мкг/мл в контроле до 14,6 мкг/мл в опытном варианте (спектрофотометрический метод).

Изучение влияния Концентрата на развитие *N. paludosum* в почве показало, что препарат оказывает сильное репрессивное действие на тест-организм. При этом сила подавления незначительно уменьшается по мере продолжительности опыта. Через 30 суток численность популяции *N. paludosum* в почве с внесением СПАВ составляла 40% по отношению к контрольному варианту (почва без препарата). Через 6 месяцев этот показатель составлял 34%, а через 12 месяцев – 32%. Данный факт, вероятно, свидетельствует о том, что процесс деградации автошампуней в почве без аборигенной микрофлоры не происходит, а интродуцированный вид ЦБ в этих процессах не участвует.

Таким образом, впервые проведенное исследование токсичности СПАВ Концентрат с использованием в качестве тест-организма ЦБ *N. paludosum* показало, что данный препарат угнетает как ферментативную активность при его воздействии на чистую культуру, так и активность размножения цианобактериальной популяции при внесении Концентрата в почву в дозе, применяемой на практике. Автор выражает признательность д.б.н., профессору Л.И. Домрачевой за помощь в подготовке тезиса.

## **Хранение актиномицетов редких родов методом низкотемпературного замораживания**

*Синёва О.Н., Терехова Л.П.*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Москва, [instna@sovintel.ru](mailto:instna@sovintel.ru)

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества биологически активных веществ, среди которых особое место занимают антибиотики. Известно, что актиномицеты редких родов синтезируют большое количество разнообразных, уникальных, сложных по строению соединений, показывающих высокую антибиотическую активность. В связи с быстро возникающей резистентностью у патогенных микроорганизмов к применяемым лекарственным средствам важное значение имеет вопрос поиска новых антибиотиков. Первым этапом поиска новых соединений является выделение актиномицетов из природных источников, главным образом из почвы. Для дальнейшего изучения необходимо поддерживать выделенные культуры в рабочем состоянии без утраты их ценных свойств. Одним из современных способов хранения микроорганизмов является замораживание и хранение культур в условиях низких температур от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-85^{\circ}\text{C}$ , стабильное поддержание которых обеспечивают современные лабораторные холодильники. Техника проведения замораживания довольно проста: культуры микроорганизмов выращивают на специализированных агаровых средах до стационарной фазы, затем смывают защитной средой или дистиллированной водой с добавлением криопротектора, криопробирки с клеточными суспензиями помещают в низкотемпературный холодильник.

Цель данного исследования – изучить влияние низкотемпературного замораживания  $-70^{\circ}\text{C}$  на выживаемость и сохранения антибиотических свойств 10 культур редких родов актиномицетов, выделенных из почвы. На основании хемотаксономического и филогенетического анализа выделенные нами культуры были отнесены к следующим родам: *Nocardia* (3 культуры), *Streptosporangium* (1 культура), *Nonomuraea* (1 культура), *Amycolatopsis* (1 культура), *Actinomadura* (2 культуры), *Saccharotrix* (1 культура), *Pseudonocardia* (1 культура). Концентрация споровых суспензий актиномицетов в опытных образцах составила  $10^7$ - $10^8$  КОЕ/мл. В качестве криопротектора использовали 10% р-р глицерина. Для оценки влияния криопротектора на выживаемость актиномицетов, контрольные образцы споровых суспензий были заморожены без криопротектора. В качестве тест-организмов использовали культуры *Staphylococcus aureus* FDA 209 P, *Micrococcus luteus* АТТС 9341, *Bacillus subtilis* АТТС 6633. Исследование показало, что актиномицеты практически полностью сохраняют жизнеспособность после двух лет хранения при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Изучение влияния замораживания на антибиотическую активность актиномицетов в отношении тест-микроорганизмов показало, что штаммы, изначально обладающие антибиотической активностью, сохраняют ее на высоком уровне 90-97% в течение всего периода хранения. Было

установлено, что криопротектор не оказывает влияния на выживаемость и антибиотическую активность изученных штаммов актиномицетов.

## **Новые термофильные хемолитоавтотрофные микроорганизмы, использующие соединения серы**

Слободкина Г.Б., Слободкин А.И.

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН gslobodkina@mail.ru

Микроорганизмы, использующие серные соединения в качестве донора или акцептора электронов в энергетическом метаболизме, являются ключевой группой прокариот биогеохимического цикла серы современной биосферы и, вероятно, играли важную роль в древних микробных сообществах. Наиболее изученными являются анаэробные сульфатвосстанавливающие и аэробные сероокисляющие бактерии, разнообразие микроорганизмов способных к использованию серных соединений с переменной валентностью исследовано менее подробно. В анаэробных условиях, соединения серы, такие как сульфит, тиосульфат, и элементная сера, могут окисляться, восстанавливаться или подвергаться диспропорционированию в процессах микробного катаболизма. За последние два года нами описано пять новых родов хемолитотрофных термофильных бактерий, использующих соединения серы. Выделенные микроорганизмы обитают в глубоководных и мелководных морских и наземных гидротермах и являются представителями *Thermodesulfobacteria*, *Firmicutes*, *Deltaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*.

У двух бактерий рост сопряжен с анаэробным окислением серы нитратом. Сера и тиосульфат окисляются до сульфата. *Inmirania thermothiophila* восстанавливает нитрат в молекулярный азот, а *Thermosulfuriphilus ammonigenes* осуществляет новый путь окисления серы нитратом с образованием аммония.

*Dissulfurimicrobium hydrothermale* и *Dissulfurirhabdus thermomarina* способны диспропорционировать соединения серы с образованием сульфида и сульфата. *Dissulfurirhabdus thermomarina* кроме того может расти, восстанавливая сульфит водородом. Таким же образом растет и *Thermodesulfitimonas autotrophica* который является облигатным сульфит-редуктором.

Полученные результаты расширяют знания о филогении и функциональных возможностях хемолитоавтотрофов и путях микробной трансформации соединений серы в термальных экосистемах.

## **Устойчивость к антибиотикам бактерий, выделенных из почв и осадков экстремальных местообитаний**

Соина В.С.,<sup>1</sup> Петрова М.А.,<sup>2</sup> Максакова С.А.,<sup>1</sup> Белов А.,<sup>1</sup> Воробьева Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Факультет почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова,  
<sup>2</sup>ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН soina@yandex.ru

В настоящее время общепринятым является мнение, что основным резервуаром генов антибиотикоустойчивости для клинических штаммов являются почвы и другие природные источники. Вместе с тем, природные механизмы устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов, выделенных из незагрязненных и экстремальных местообитаний, остаются до сих пор мало изученными. Данные, полученные при изучении жизнеспособных бактерий из подобных биотопов, позволяют рассматривать их как модели для исследования природных механизмов устойчивости к различным стрессам, в том числе не связанным с антропогенным воздействием. Нами были исследованы спектры устойчивости к антибиотикам у бактерий, выделенных из арктических и антарктических почв и вечномерзлых осадков, а также пустынных почв пустыни Негев (Израиль) и пустыни Тар (Индия), поверхностных песков пустынь Сахара и Намиб (Африка), песков пустыни Гиббсона (Австралия) и Мохаве (США). Использовали широкий спектр антибиотиков разных классов, а их концентрации были

подобраны ранее экспериментальным путем как наиболее оптимальные для выявления бактерий, устойчивых к антибиотикам. Бактерии, устойчивые к антибиотикам, были выделены из всех типов экосистем. Наиболее широкими спектрами устойчивости, обладали штаммы, выделенные из образцов почв и осадков Арктики и Антарктиды, являющихся экстремально холодными местообитаниями, а также песков пустынь Намиб и Мохаве, характеризующихся крайне засушливыми условиями и высокой температурой. Среди бактерий, выделенных из почв и осадков холодных местообитаний, в том числе из «древних» вечномерзлых осадков около 70% штаммов обладали устойчивостью к двум и более антибиотикам. Было отмечено, что разные бактерии проявили резистентность к разным комбинациям антибиотиков, а в некоторых антарктических и арктических местообитаниях выделялись штаммы, обладающие уникальным для данного местообитания спектром устойчивости. Сравнение спектров устойчивости антарктических штаммов бактерий и бактерий из загрязненных местообитаний показало, что наличие множественной устойчивости к антибиотикам не является исключительно реакцией на антропогенное воздействие. Возможно, экстремальные условия обитания способствуют отбору видов с врожденной устойчивостью к антибиотикам, обусловленной специфическим строением клеточной стенки и наружных покровов, препятствующим проникновению антибиотика в клетку, или обладающими системами активного транспорта антибиотиков из клетки.

*Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН «Эволюция органического мира и планетарных процессов» (ПРАН I.22П), гранта Российского научного фонда №14-50-00029 «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» (в части выделения культур микроорганизмов, их идентификации и хранения), гранта РФФИ №14-04-01917.*

## Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий рода *Rathayibacter*

Стрешинская Г.М.<sup>1</sup>, Тульская Е.М.<sup>1</sup>, Потехина Н.В.<sup>1</sup>, Шапков А.С.<sup>2</sup>, Дмитренко А.С.<sup>2</sup>,  
Сенченкова С.Н.<sup>2</sup>, Дорофеева Л.В.<sup>3</sup>, Стародумова И.П.<sup>3</sup>, Евтушенко Л.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,  
streshinskaya@mail.ru

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва

<sup>3</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино

Виды рода *Rathayibacter* (*Microbacteriaceae*, *Actinomycetales*), за исключением *R. caricis* и *R. festucae*, известные как фитопатогены, поражающие пшеницу и злаковые травы (*Poaceae*); переносятся на растения галлообразующими фитопатогенными нематодами рода *Anguina* (*Anguinidae*). Большинство видов *Rathayibacter* имеют высокий уровень сходства 16S рРНК генов (>до 99%) и фенотипических характеристик.

Изучен состав гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов видов *R. iranicus*, *R. tritici*, *R. festucae*, а также представителей новых видов “*Rathayibacter oskolensis*” и “*Rathayibacter tanacetii*” (данные MALDI-TOF масс-спектрометрии и мультилокусного анализа на основе генов *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *ppk*).

В составе гидролизатов клеточных стенок изученных бактерий обнаружены Man, Rha, Glc, Xyl, Gal. Выявлены общие для рода *Rathayibacter* и характерные для представителей видов особенности состава и структуры гликополимеров. Присутствующий у всех штаммов нейтральный полимер состоит из остатков Rha и Man, объединенных  $\alpha$ -1→2 и/или  $\alpha$ -1→3 гликозидными связями; в большинстве случаев с боковыми остатками Man или Xyl. Все штаммы (кроме “*Rathayibacter tanacetii*” ВКМ Ac-2596) содержат также кислые гликополимеры (тейхуроновые кислоты) с характерным для каждого вида составом моносахаридов. В некоторых полимерах найдены остатки пировиноградной и молочной кислот.

Во всех клеточных стенках имеются гликополимеры, содержащие D-изомер рамнозы – редкий компонент клеточных стенок грамположительных бактерий (обычно встречается L-рамноза /<http://csdb.glycoscience.ru/>). Интересно также отметить, что единственный штамм (“*Rathayibacter tanacetii*”), у которого не выявлен кислый полимер, выделен не из злаков, а из пижмы (*Tanacetum vulgare*, *Asteraceae*), инфицированной листовой нематодой *Aphelenchoides fragariae* (*Aphelenchoididae*).

Клеточные стенки всех изученных ратайбактеров содержат гликополимеры ранее не описанных у грамположительных бактерий структур. Полученные результаты расширяют представления о биосинтетическом потенциале микроорганизмов, представляют интерес в связи с решением задач таксономии и выяснением механизмов взаимодействия компонентов фитопатогенных комплексов «бактерия-нематода» между собой и растениями.

*Работа частично поддержана грантом РФФИ 16-34-01048 мол\_а.*

## **Обнаружение бактериофагов в подземных льдах Арктики**

*Сургучева<sup>1</sup> Н.А., Филиппова<sup>1</sup> С.Н., Гальченко<sup>1</sup> В.Ф., Брушков<sup>2</sup> А.В., Rogov<sup>2</sup> В.В.*

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, геологический факультет, Москва, natshasur@rambler.ru

В криолитозоне Арктического региона широко распространены подземные льды, образующие в мерзлых толщах пород самостоятельные образования различного генезиса. Исследования последних лет показали, что ледяные включения в мерзлых грунтах являются благоприятными для сохранения микроорганизмов. В то же время наличие жизнеспособной микрофлоры предусматривает и возможность сохранения вирусной (фаговой) составляющей микробного сообщества. В настоящее время данные о фагах подземных льдов Арктики практически отсутствуют, хотя известно, что в полярных экосистемах она может играть ключевую роль в стратегии выживания микробных сообществ.

Нами впервые были исследованы образцы подземных льдов: 1) жильные льды, формирующиеся по морозобойным трещинам; 2) инъекционный лед (возраст 5000 лет) – результат внутригрунтового замерзания и кристаллизации подземных вод; 3) пластовый лед, происхождение которого в настоящее время носит дискуссионный характер.

Было проведено электронно-микроскопическое изучение образцов: 1 - нативные отстои расплавов льда; 2 - лизогенные культуры микроорганизмов, выделенные из этих же образцов.

Наибольшее морфологическое разнообразие фаговых частиц наблюдалось в расплаве инъекционного льда из керна бугра пучения (п-в Ямал). При исследовании прозрачных расплавов пластового льда (п-ов Гыдан, Карское море) фаговые частицы не были обнаружены. Однако, на одной из бактериальных колоний, выделенной из этого образца льда, были отмечены фаговые бляшки. Изучение материала, отобранного из стерильных зон были обнаружены фаговые частицы, сходные по морфологии с сифовирусами. Значительное количество фаговых частиц, имеющих сходство с сифовирусами было выявлено в голоценовых (возраст 5000-10000 лет) и плейстоценовых (возраст 40000-46000 лет) ледяных жилах ледового комплекса Мамонтовой горы (Центральная Якутия). При прямом подсчете в электронном микроскопе выявлено, что количество фаговых частиц в образце голоценовой ледяной жилы составляло  $10^8$  в мл расплава льда, а в плейстоценовой –  $10^9$  частиц/мл.

Необходимо отметить, что присутствие в образцах фаговых частиц тесно связано с бактериальным сообществом. Наблюдается определенная корреляция между численностью выживших клеток в образцах и наличием фаговых частиц. Так, в пластовом льду, где количество живых клеток было низким ( $3 \times 10^4$  кл/мл), фаговые частицы не выявлялись, а были обнаружены только в клетках лизогенного изолята. В ледяных жилах ледового комплекса Мамонтовой горы численность выживших клеток достигала  $10^7$  кл/мл (в голоценовой жиле) и  $10^6$  кл/мл (в плейстоценовой жиле), соответственно и количество фаговых частиц было высоким.

Проведенное исследование подтверждает, что фаги являются неотъемлемой частью микробных сообществ низкотемпературных экосистем хранения.

# **TaxonDC: программа для расчета сходства последовательностей генов 16S рРНК или ITS-регионов грибов**

*Тарлачков С.В.<sup>1,2</sup>, Стародумова И.П.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

<sup>2</sup>Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

<sup>3</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, sergey@tarlachkov.ru

В последнее время в систематике про- и эукариот широко используются молекулярно-генетические методы анализа. В качестве основного филогенетического маркера для бактерий и архей предложен ген малой субъединицы рибосомальной РНК (16S рРНК). Большинство филогенетических исследований для грибов выполнено на основе последовательностей ITS-региона (ITS1–5.8S рРНК–ITS2), включающего, кроме внутренних транскрибируемых спейсеров 1 и 2, также ген субъединицы 5.8S рРНК между ними.

Вычисление процента сходства между последовательностями этих генов является надежным критерием для идентификации нового изолята (с использованием баз данных). Существующие программы, которые могут вычислять уровни сходства между желаемыми последовательностями (основная задача ряда лабораторий), имеют ряд недостатков. Во-первых, значения сходства, рассчитанные этими программами, не всегда соответствуют значениям, рассчитанным на популярном сервере идентификации EzBioCloud. Во-вторых, программное обеспечение обычно выполняет множественное выравнивание всех введенных последовательностей и не подходит для полностью независимых их попарных сравнений.

TaxonDC (Taxon Distance Calculator) – новая, разработанная нами программа, предназначена для вычисления сходства между последовательностями генов 16S рРНК прокариот или ITS-регионами грибов. Программа выполняет только попарное выравнивание последовательностей с последующим вычислением процента сходства между двумя или более интересующими последовательностями. Значения сходства, рассчитанные TaxonDC, аналогичны значениям, рассчитанным на сервере EzBioCloud. Также в TaxonDC учтен факт расхождения значений сходства между парой сравниваемых последовательностей (эта особенность также присуща EzBioCloud). В этом случае, мы рекомендуем выбирать большее значение сходства, поскольку оно соответствует потенциально меньшему числу эволюционных событий.

Программа имеет дружелюбный интерфейс, написана на C++ с применением библиотеки Qt. В качестве внешнего программного обеспечения для выравнивания последовательностей TaxonDC использует ClustalW. Сходство между последовательностями рассчитывается без учета гэпов и вырожденных нуклеотидов, чтобы уменьшить влияние качества сиквенсов. Программа работает под Windows и Linux и свободно доступна на сайте <https://tarlachkov.ru/ru/software/taxondc>.

Таким образом, TaxonDC может быть полезен широкому кругу исследователей, работающих в области филогенетики, экологии и систематики про- и эукариот.

## **Оценка разнообразия микробных сообществ почв по липидным маркерам: возможности и ограничения**

*Терехова В.А.<sup>1,2</sup>, Верховцева Н.В.<sup>1</sup>, Федосеева Е.В.<sup>3</sup>, Розенцвиг О.А.<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г.Москва, факультет почвоведения МГУ, vterekhova@gmail.com

<sup>2</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, ул.Островитянова, дом 1 Москва, elenfedoseeva@gmail.com

<sup>4</sup>Институт экологии Волжского бассейна РАН, Россия, Тольятти, olgarozen55@mail.ru

Липиды – очень разнородная группа органических соединений, участвующих в построении клеточных мембран, обеспечении энергетического резерва живых организмов, защитных функций и продукции важнейших метаболитов. Они привлекают внимание в исследованиях взаимоотношений микроорганизмов и растений, этапов синтеза органического вещества в природных средах, в том числе, в почвах, при изучении динамики физико-химических свойств объектов, в палеопочвоведении, работах по оценке биоразнообразия и экологического статуса почв. В последнее время значительно возрос интерес к исследованию биомаркерной функции липидных компонентов почв. Этот интерес объясняется большой устойчивостью липидов к внешним воздействиям, что позволяет их надежно идентифицировать в почве, почвогрунтах и донных отложениях. Анализ публикаций по базе данных Web of Science показал, что всего лишь за одно десятилетие (2007-2016гг.) упоминание одного из методов анализа липидов в почвах - PLFA встречается в 1525 работах, посвященных оценке биоразнообразия с помощью молекулярных маркеров животного и микробного происхождения.

В докладе критически проанализированы и обобщены современные представления о методах анализа липидных компонентов, использующихся в качестве биомаркеров при характеристике экологического состояния почв, биоразнообразия и жизнеспособности почвенной микробиоты. Приводятся примеры успешной реконструкции микробных сообществ по липидным маркерам, выявляемым методом ГХ-МС, на основе результатов собственных исследований и публикаций других авторов. В наших работах с помощью хемодиагностики жирных кислот, гидроксикислот и альдегидов изучена структура бактериальных и грибных сообществ почв ряда нарушенных почв урбоэкосистем. Установлена индикационная значимость определенных видов и родов, рассчитаны индексы биоразнообразия почвенной микробиоты, позволившие оценить изменения экологического состояния почв при воздействии автотранспорта, промышленных отходов, повышенного содержания органического вещества, солей тяжелых металлов.

Важно отметить, что одновременно накопилось немало сведений, ограничивающих широкое использование методов липидного анализа в экологических исследованиях почв, в изучении структурных изменений почвенных микробных сообществ. Обсуждаются перспективность и проблемы в применении отдельных способов извлечения липидных соединений для характеристики особенностей почв и почвенной биоты в различных экологических условиях: под разными типами растительности, в условиях разной обогащенности углеродом, влажности, при разных условиях землепользования.

*Работа выполняется при поддержке Президиума РАН «Биоразнообразии природных систем».*

## **Встречаемость колиформных бактерий в поверхностных водных объектах города Рязани**

*Трунякова А.С., Зацаринная Е.А.*

ФГБОУ высшего образования Рязанский государственный университет имени С. А. Есенина,  
Sasha\_trunyakova@mail.ru

Активное многолетнее освоение регионов центра Европейской части России сильно сказалось на экологическом состоянии водных объектов. Особое место занимают в этом ряду водоемы и водотоки, располагающиеся на территориях, занятых городскими поселениями.

Одним из основных элементов оценки состояния санитарно-микробиологических показателей вод поверхностных водных объектов служит характеристика состава и состояния сообществ энтеробактерии. Для того, чтобы провести оценку санитарно-микробиологического состояния водных объектов в г. Рязани был произведен отбор проб в октябре 2017 года из следующих водотоков: р. Плетенка, р. Павловка, р. Трубеж и р. Лыбедь. В воды этих рек сбрасывается немало коммунально-бытовых стоков, что свидетельствует о сильном загрязнении р. Ока, в которую впадает эта водная система. Данные реки исследовались на встречаемость в воде общих колиформных бактерий (ОКБ) и термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ).

По результатам исследования видно, что ни один из исследуемых водотоков полностью не соответствовал санитарно-гигиеническим требованиям, согласно которым численность ОКБ должна составлять не более 1000 КОЕ/100 мл, а ТКБ – не более 100 КОЕ/100мл. Минимальная численность ОКБ была выявлена в пробах из р. Плетенка и составляла 1009 КОЕ/100 мл, а максимальная – в р. Павловка (16863 КОЕ/100 мл). Численность ТКБ так же различна, хотя в среднем остается ниже численности ОКБ. Самое большое число ТКБ также зарегистрировано в р. Трубеж (2136 КОЕ/100 мл), тогда как наименьшее – в р. Плетенка (74 КОЕ/100 мл). Такая большая численность колиформов в р. Павловка объясняется началом строительства окружной дороги в районе этой реки, а так же канализационными стоками в Трубеж. Самой чистой рекой является Плетенка. Она наиболее удалена от города и поэтому численность колиформов в ней близка к нормам.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Рязанской области в рамках научного проекта № 16-44-620157.

## Гликополимеры клеточных стенок актинобактерий *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ВКМ Ас-1403<sup>T</sup> и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371

Тульская Е.М.<sup>1</sup>, Ким Д.<sup>1</sup>, Стрешинская Г.М.<sup>1</sup>, Шаиков А.С.<sup>2</sup>, Дмитренко А.С.<sup>2</sup>, Сенченкова С.Н.<sup>2</sup>, Стародумова И.П.<sup>3</sup>, Присяжная Н.В.<sup>3</sup>, Дорофеева Л.В.<sup>3</sup>, Евтушенко Л.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,  
em\_tulskaya@mail.ru

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва

<sup>3</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

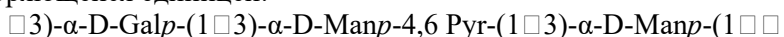
Цель исследования – сравнительное изучение моносахаридного состава, набора и структуры гликополимеров клеточных стенок типового штамма *Cl. michiganensis* subsp. *michiganensis* ВКМ Ас-1403<sup>T</sup> (фитопатоген) и штамма *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, выделенного из *Salsola* sp. (солянка) без выраженных признаков заболевания. Согласно результатам филогенетического анализа (16S рРНК, *GyrB*) и MALDI-TOF спектров целых клеток, штамм ВКМ Ас-1371 относится к новому подвиду *Cl. michiganensis*.

В составе клеточных стенок обоих штаммов преобладающими моносахаридами оказались галактоза и манноза. У типового штамма дополнительно найдены рамноза, фукоза и глюкозамин, тогда как у изолята из *Salsola* sp. – рибоза.

Изучение моносахаридного состава в гидролизатах клеточных стенок позволяет локализовать найденные моносахариды, а также выявить таксон-специфичные моносахариды.

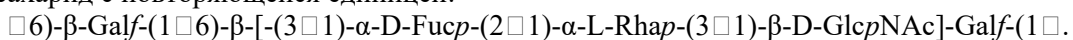
Химическими и ЯМР-спектроскопическими методами были определены состав и структура гликополимеров клеточных стенок изучаемых штаммов.

В составе клеточных стенок обоих штаммов не выявлены фосфат-содержащие гликополимеры, но обнаружен идентичный по структуре кислый гликополимер со следующей повторяющейся единицей:



Наличие кетально связанного остатка пировиноградной кислоты обуславливает отрицательный заряд гликополимера.

В клеточных стенках штамма ВКМ Ас-1403<sup>T</sup> присутствует также нейтральный полисахарид с повторяющейся единицей:



У штамма ВКМ Ас-1371 обнаружен нейтральный полисахарид другой структуры:  $\square 6)-\beta\text{-D-Gal}f-(1 \square 6)-\beta\text{-D-}[(2 \square 1)-\alpha\text{-D-Ribf}-(2 \square 1)-\alpha\text{-D-Manp}]\text{-Gal}f^2-(1 \square \square$

Таким образом, представители разных подвидов *Cl. michiganensis* имеют различные профили моносахаридов и гликополимеров клеточных стенок. Следует также отметить, что вышеуказанные структуры полимеров обнаружены у прокариот впервые.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 16-34-01048 мол\_а.

# Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: история и перспективы

Турковская О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049 г. Саратов, просп. Энтузиастов 13,  
turkovskaya\_o@ibppm.ru

Сохранение и развитие биологических коллекций в Российской Федерации является частью приоритетной межведомственной и междисциплинарной проблемы сохранения биоресурсов, биоразнообразия, укрепления био- и продовольственной безопасности государства, решение которых служит основой устойчивого развития российской науки в целом, современных наукоемких производств, подготовки квалифицированных кадров. Российские коллекции микроорганизмов представлены рядом крупных собраний, претендующих на статус биоресурсных центров, а также специализированными коллекциями при научных и учебных организациях, имеющими небольшие фонды, однако заслуживающими не меньшего внимания. Как правило, они обладают одновременно с поддерживаемыми культурами и наиболее полной информацией о них, поскольку те служат объектом научных исследований организации.

Именно такой является Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, включающая около 500 штаммов бактерий различных родов, выделенных, в основном, из корневой зоны растений. Она является результатом преобразования коллекции непатогенных микроорганизмов, созданной в 1981 г. с целью выяснения роли ассоциативных азотфиксирующих микроорганизмов в обеспечении азотным питанием зерновых культур. Ее основу составляют ассоциативные к растениям бактерии, обладающие фитостимулирующей активностью, среди которых особую значимость имеет собрание штаммов альфа-протеобактерий, принадлежащих к роду *Azospirillum* – около 150 культур, большая часть которых выделена из ризосферы диких и культурных злаков в ходе проведенных экспедиций по Саратовской области. Получены и поддерживаются практически все типовые штаммы известных в настоящее время 17 видов бактерий рода *Azospirillum*. Сегодня это самое большое собрание азоспирилл не только в России, но и в Европе. С использованием коллекционных штаммов в ИБФРМ РАН получен большой массив новых знаний по молекулярным основам взаимодействий ассоциативных микроорганизмов с растениями – основной проблематике института. Эти данные отражены в 78 кандидатских и докторских диссертациях, защищенных сотрудниками ИБФРМ РАН. Опубликовано более 600 работ в ведущих российских и международных научных изданиях. Ряд изобретений защищены патентами РФ.

Коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН зарегистрирована во Всемирной федерации коллекций культур (World Federation for Culture Collections, WFCC) и Всемирном центре данных о микроорганизмах (World Data Centre for Microorganisms, WDCM), на сегодняшний день она является единственной в мире, имеющей такую специфику и направленность работы.

Таким образом, на примере Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН весьма отчетливо видно большое значение подобных специальных собраний для фундаментальных и прикладных аспектов биологической науки.

## Антагонистическая активность *Wickerhamomyces anomalus*

Фарофонова В.В.<sup>1,2</sup>, Стародумова И.П.<sup>1,2</sup>, Присяжная Н.В.<sup>1</sup>, Томашевская М.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,

<sup>2</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт  
*CrazyTide@yandex.ru*

Дрожжи *Wickerhamomyces anomalus* (Hansen) Kurtzman *et al.* обнаруживаются практически во всех регионах мира и самых разных субстратах. Данный вид представляет



интерес для получения полиолов, фитазы, но особо пристальное внимание он привлекает благодаря антибиотической активности, которая может быть использована для подавления патогенных и портящих продукты грибов. *W. anomalus* синтезирует такие антифунгальные агенты как софоролипиды и микоцины. Последние белковой природы и характеризуются таксоноспецифичностью, т.е. действуют на филогенетически родственные виды.

Нами изучены 8 штаммов *W. anomalus* ВКМ из фонда ВКМ, поступившие в коллекцию как типовые штаммы видов и разновидностей (*Hansenula anomala* var. *longa*, *H. anomala* var. *robusta* и *H. anomala* var. *productiva*; *H. javanica*; *H. schneegii*), но в настоящее время их наименования рассматриваются как синонимы. Результаты секвенирования регионов ITS1-5.8S-ITS2 (~600 п.н.) и D1/D2 LSU (~580 п.н.) показали, что изученные штаммы образуют тесный кластер с имеющимися данными для типового штамма этого вида (NRRL Y-366<sup>T</sup>). Результаты изучения МАЛДИ-ВП масс-спектров согласуются с генетическими данными и подтверждают принадлежность изученных культур к виду *W. anomalus*.

В работе на чувствительность к внеклеточным соединениям, образуемым представителями *W. anomalus*, нами были обследованы аскомицетные дрожжи (главным образом, типовые штаммы и типовые виды) разных семейств, порядков и классов, всего 164 вида. Установлено, что к их антифунгальным агентам нечувствительны виды, принадлежащие классам *Schizosaccharomycetes* и *Taphrinomycetes* (подтип *Taphrinomycotina*), а также виды семейств *Dipodasaceae*, *Lipomycetaceae* и *Phaffomycetaceae* класса *Saccharomycetes* (подтип *Saccharomycotina*). Лишь единичные чувствительные виды (как правило, слабо) присутствуют в семействах *Debaryomycetaceae* и *Saccharomycopsidaceae*. Чувствительные виды найдены в восьми семействах *Saccharomycetes*, но относительные их количества в них весьма разнятся. В частности, примерно треть видов чувствительна в семействах *Saccharomycetaceae* и *Saccharomycodaceae*, и около половины видов – в семействах *Metschnikowiaceae*, *Pichiaceae* и *Trichomonascaceae*. Чувствительны к антифунгальным агентам *W. anomalus* все обследованные типовые штаммы типовых видов родов *Barnettozyma*, *Cyberlindnera*, *Starmera* и *Wickerhamomyces* (*Wickerhamomycetaceae*).

Таким образом, использованные методы генетического анализа и МАЛДИ масс-спектрометрии не выявили значительных различий между исследованными штаммами и подтверждают принятую синонимию.

## **'*Desulfothermobacter acidiphilus*' gen. nov., sp. nov. новая термоацидофильная сульфатредуцирующая бактерия из термального источника полуострова Камчатка**

<sup>1</sup>Е.Н. Фролов, Н.А. Черных

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр  
Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва

<sup>1</sup>Автор для корреспонденции, evgenii\_frolov\_89@mail.ru

Из термального источника Подкаменный с подножия вулкана Мутновский полуострова Камчатка был выделен новый штамм 3408-1<sup>T</sup>. Клетки нового штамма имели палочковидную форму. Длина клетки – 3–6 мкм, диаметр – 0.6 мкм. Ультратонкие срезы клеток штамма 3408-1<sup>T</sup> показали наличие грамположительной клеточной стенки. Внутриклеточных включений и внутренних мембран обнаружено не было. Новый штамм был способен образовывать круглые терминальные эндоспоры.

Штамм 3408-1<sup>T</sup> являлся анаэробом, для которого также была показана способность к росту в микроаэробных условиях (до 2% кислорода в газовой фазе) после продолжительной лаг-фазы. Штамм 3408-1<sup>T</sup> являлся умеренным термофилом, который рос в диапазоне 42–70°C с оптимумом при 55°C, и умеренным ацидофилом с ростом в интервале рН 2.9–6.5 с оптимумом при 4.5.

Штамм 3408-1<sup>T</sup> рос в хемолитоавтотрофных условиях с Н<sub>2</sub> в качестве донора электронов, НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>/СО<sub>2</sub> в качестве источника углерода и сульфатом в качестве акцептора электронов. Сульфид был единственным конечным продуктом в процессе сульфатного дыхания. В качестве альтернативных субстратов для сульфатредукции штамм 3408-1<sup>T</sup> использует дрожжевой экстракт, мальтозу, сахарозу и глюкозу. Штамм 3408-1<sup>T</sup> был способен к сбраживанию дрожжевого экстракта, мальтозы, сахарозы и глюкозы. В присутствии Н<sub>2</sub>/СО<sub>2</sub> (80:20) в газовой

фазе штамм 3408-1<sup>T</sup> был способен к дыханию на тиосульфате, но не использовал нитрат, нитрит, арсенат, селенат, элементную серу, Fe (III) цитрат, фумарат и O<sub>2</sub> в качестве акцепторов электронов.

Филогенетический анализ показал, что организм 3408-1<sup>T</sup> относится к семейству *Thermoanaerobacteraceae* и наиболее близок к представителям рода *Ammonifex*, однако, последовательность гена 16S рРНК штамма 3408-1<sup>T</sup> имеет лишь 93% сходства с аналогичными последовательностями *A. degensii* и *A. thiophilus*. На основании вышеприведённых результатов нами был предложен новый род '*Desulfothermobacter*' с типовым видом '*Desulfothermobacter acidiphilus*'.

## **Биоразнообразие экстремофильных микробных сообществ Терско–Кумской низменности (Республика Дагестан)**

Халилова Э.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А., Аливердиева Д.А.

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, Махачкала, eslanda61@mail.ru

Республика Дагестан является уникальной природной провинцией России и обладает многообразием природных ландшафтов, благодаря влиянию тектонических процессов, естественной эрозии почв и повторяющихся трансгрессий и регрессий Каспийского моря. Определенный интерес вызывают микроорганизмы, изолированные из природных объектов Терско – Кумской низменности с признаками аридизации и опустынивания ландшафтов. Образцы почвы и растения галофита *Halostachys caspica* L. отобраны в северо-западной части Терско – Кумской низменности, в 3 км к юго-западу от Кочубейской биосферной станции. Географические координаты региона исследований: северо-восточная граница - 44°46' с.ш., 47°10' в.д.; юго-восточная - 44°22' с.ш., 47°00' в.д. Таксономические исследования с использованием генетических и молекулярно-биологических методов проводились впервые. Из микробных сообществ солонцово-солончаковых почв и галофитов выделено до 40 видов бактерий. Достоверно доминирующими в образцах анализируемых почв были изоляты бактерий родов *Salinicola*, *Marinobacter*, *Microbacterium*, *Salinibacterium*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Planomicrobium*, *Salegentibacter*, *Microbispora*.

При большом разнообразии почвенных микроорганизмов олиготрофные бактерии *Bacillus* и *Salimicrobium* являются основными компонентами экстремофильных микробных сообществ засоленных почв. Выделенные штаммы демонстрировали устойчивый рост к 5-10 % NaCl при pH 7.2-7.4 и температуре 30-37<sup>o</sup>C. Для штаммов получены и секвенированы фрагменты генов 16S рРНК различной степени вариабельности. Согласно предварительному скринингу секвенированных фрагментов по базе данных GenBank они относились к родам *Bacillus*, *Salimicrobium* филогенетической линии *Firmicutes*. Всестороннее изучение экстремофильных аборигенных микроорганизмов засоленных почв (полупустынь) Терско – Кумской низменности, способных выдерживать высокие концентрации солей и адаптироваться к воздействию экстремальных факторов среды, может представлять научный и практический интерес для перспективного использования их в биотехнологиях различного назначения. Так штаммы *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Salimicrobium halophilum* с экономным метаболизмом и активным ферментативным аппаратом способны разлагать ксилан, восстанавливать сульфат до каталазы; могут быть использованы в производстве экзоферментов, щелочной протеазы и ксиланазы; синтезировать антибиотики, являются продуцентами ферментов амилазы и протеазы. *B. licheniformis* и *B. clausii* принимают участие в структурообразовании, выполняют функции компонента дезинфекции почвы, могут быть использованы в составе сельскохозяйственных удобрений.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН 1.21. «Биологическое разнообразие природных систем. Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга».*

## Летучие органические соединения, синтезируемые бактериями: функциональная и экологическая роль

Хмель И.А.<sup>1</sup>, Кокшарова О.А.<sup>1,2</sup>, Попова А.А.<sup>1</sup>, Плюта В.А.<sup>1</sup>

ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, khmel@img.ras.ru; НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, oakoksharova@rambler.ru

В последние годы большой интерес вызывает направление исследований, связанное с изучением летучих органических соединений (ЛОС), синтезируемых микроорганизмами. Оказалось, что бактерии и грибы выделяют огромное количество ЛОС различной химической природы, которые могут подавлять рост других микроорганизмов, модулировать рост растений, действовать на насекомых. Кроме того, ЛОС функционируют как сигналы дистанционной коммуникации нового типа между различными организмами («infochemicals»). Синтез ЛОС обуславливает мало изученный аспект конкурентных отношений между микроорганизмами и их взаимодействия с высшими организмами. Недавно была опубликована первая база данных идентифицированных ЛОС, продуцируемых бактериями и грибами (более 1000 ЛОС). Не вызывает сомнений, что избыток ЛОС, выделяемых микроорганизмами, является важным арсеналом новых веществ, которые могут быть использованы в медицине, биотехнологии, сельском хозяйстве. Механизмы биосинтеза и действия бактериальных ЛОС изучены очень слабо, отсутствуют сведения о генетической регуляции синтеза ЛОС у бактерий.

Объектами нашей работы были ризосферные и почвенные бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*. С помощью методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии были идентифицированы ЛОС, синтезируемые несколькими штаммами этих бактерий (совместно с сотрудниками Иерусалимского университета, Израиль); в наибольшем количестве бактерии синтезировали кетоны, алкен ундецен, диметилдисульфид (ДМДС). Было показано, что суммарные газовые смеси, выделяемые бактериями, и индивидуальные ЛОС оказывали ингибиторное действие на агробактерий, в том числе, образующих биопленки, цианобактерий, фитопатогенных грибов, нематод, дрозофил и растений (*Arabidopsis thaliana*). Впервые было установлено, что ЛОС бактерий способны подавлять функционирование Quorum Sensing (QS) систем регуляции экспрессии генов бактерий. Действие изученных ЛОС - кетонов и ДМДС - снижало экспрессию генов *katG*, *soxS* and *oxyS*, индуцируемых окислительным стрессом. С целью выяснения механизмов действия ЛОС получены транспозонные мутанты цианобактерий, устойчивые к действию кетонов; локализованы гены, определяющие устойчивость к кетону 2-нонанону. Проводится работа по протеомному анализу экспрессии белков при действии ЛОС (совместно с сотрудниками лаборатории протеомики, рук. В.М. Говорун, Институт биоорганической химии РАН).

## Разнообразие ассоциативных микроорганизмов и специфика микробно-растительных взаимодействий с эпифитными орхидными

Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Криницына А.А., Леонтьева М.А., Нетрусов А.И

Кафедра микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, tsavkelova@mail.ru

Эпифитные тропические орхидные составляют одну треть от одноимённого семейства с более чем 26 500 видами. Среди ряда особенностей этих растений - наличие не только субстратных, но и воздушных корней, покрытых многослойным губчатым веламеном, необходимым для транспирации, удержания воды и защиты от УФ света и механических повреждений. Эта структура также благоприятствует заселению ризопланы ассоциативными микроорганизмами: фототрофными (цианобактерии) и гетеротрофными бактериями, а также микромицетами, которые не только колонизируют корневую поверхность, но и являются эндифитами, проникая через веламен, обнаруживаясь в коровой паренхиме.

Воздушные корни *Acampe praemorsa* и *Dendrobium moschatum* заселены бактериями в разы больше, чем их субстратные корни (213,5 против  $7,6 \times 10^6$  КОЕ/г и 300 против  $0,24 \times 10^6$

КОЕ/г, соответственно). Среди эндофитов, выделенных традиционным культуральным способом, наибольшее распространение имеют представители родов *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Microbacterium*. С помощью метагеномного анализа на платформе MiSeq (Illumina) среди доминирующих популяций ассоциативных бактерий на воздушных корнях *D. moschatum* также оказались представители родов *Microbacterium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Chryseobacterium*, *Paenibacillus*, *Aeromonas* и *Pseudomonas*, а на субстратных корнях - *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Phaeosporillum*, *Flavobacterium*, *Agrobacterium*, *Paenibacillus* и *Acinetobacter*. Кроме того, на воздушных корнях присутствуют представители порядка *Cytophagales*, разнообразные актинобактерии и метилобактерии, а на субстратных корнях - представители порядка *Burkholderiales* и *Enterobacteriales*.

С помощью конфокальной микроскопии на примере видов рода *Dendrobium* (*D. moschatum*, *D. nobile*), а также GFP-штаммов бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *Klebsiella oxytoca* было показано, что взрослые растения с хорошо развитой корневой системой не проявляют строгой специфичности в выборе бактериальных партнёров, в то время как для успешного прорастания их семян в условиях *in vitro* необходима селекция PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) штаммов, способных к биосинтезу ауксина (индолил-3-уксусная кислота) и в то же время не образующих чрезмерных количеств внеклеточных полисахаридов, затрудняющих развитие мельчайших семян. Среди микроорганизмов, колонизирующих эпифитные орхидные, выделены активные продуценты ИУК, а также гиббереллинов (микроспидии). С помощью различных аналитических и молекулярно-генетических методов изучены пути биосинтеза этих соединений и выявлены особенности влияния фитогормонов на образование ассоциации с растением-хозяином. PGPR значительно ускоряют прорастание и развитие семян, что позволяет использовать бактериализацию, как эффективный способ семенного размножения редких и исчезающих видов этих растений.

## **Структура микробных сообществ в профилях черноземов 120-летнего полевого эксперимента на основе анализа гена 16S рНК**

Чернов Т.И., Семенов М.В., Тхакахова А.К., Железова А.Д., Кутовая О.В.

ФГБНУ «Почвенный институт им. В.В. Докучаева», chern-off@mail.ru

Многолетние полевые опыты являются удобными и часто используемыми объектами для оценки изменения почвенных микробных сообществ под влиянием различных факторов по прошествии больших периодов времени. В данной работе с помощью высокопроизводительного секвенирования ампликонов 16S рНК и количественной ПЦР был проведен сравнительный анализ микробиомов в профилях черноземов под тремя системами землепользования (пашней, залежью и защитной лесополосой) в рамках уникальных длительных полевых опытов, заложенных В.В. Докучаевым в 1892 году.

Содержание органического углерода оказалось наиболее значимым фактором, определяющим численность прокариотов в исследуемых образцах. Прокариотное сообщество черноземов было представлено преимущественно 10-ю филумами бактерий (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*) и археями группы *Thaumarchaeota*, доля представителей других филумов не превышала долей процента. Среди разных таксонов микроорганизмов, доля филума *Verrucomicrobia* (преимущественно рода *Chthoniobacter*) наиболее сильно менялась в зависимости как от глубины, так и от типа землепользования, достигая максимума в верхних слоях чернозема под лесополосой. Вопреки распространенным представлениям, пахотная почва не характеризовалась более низким филогенетическим разнообразием и общей численностью микроорганизмов по сравнению с почвами под лесом и залежью, за исключением уплотненного подпахотного слоя (плужной подошвы).

Разница в структуре микробных сообществ разных горизонтов оказалась значительно выше разницы между типами землепользования. Согласно анализу сходства по метрикам Брея-Кертиса и UniFrac, структура микробиома не просто меняется с глубиной, но четко кластеризуется на микробиомы А (верхних органогенных) и В (нижних минеральных) горизонтов, а микробиомы АВ (переходных) горизонтов занимают промежуточное положение между ними. Резкое снижение микробного разнообразия в подпахотном слое, а также

принципиальные различия численности и структуры микробиомов А и В горизонтов демонстрируют преимущества исследований распределения микробных сообществ не просто на разных глубинах, а в разных генетических горизонтах почвенного профиля.

*Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 17-16-01057.*

## **О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса**

*Щеголев С.Ю.*

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,  
Саратов, shegolev\_s@ibppm.ru.

Обсуждаются проблемы таксономических исследований прокариот, проявляющиеся в повседневной лабораторной практике и приобретшие особую остроту в связи с опубликованием в последние годы ряда принципиальных обобщающих работ в области сравнительной геномики и биоинформатики. На примере представителей родов *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Ochrobactrum*, *Rothia*, *Stenotrophomonas* и др. демонстрируются возможности и ограничения традиционных филогенетических маркеров – последовательностей генов 16S рРНК и интергенного спейсера ITS1 в связи с внутригеномной гетерогенностью рибосомного оперона *rrn* (обусловленной, в том числе, влиянием горизонтального переноса генов – ГПП) и ролью ГПП в целом в процессах видообразования у прокариот.

Отмечается значение концепции пангенома для интерпретации таксономических данных, полученных с использованием разнообразных филогенетических маркеров (и адекватных методов исследования, относящихся к его базовой и подвижной составляющим, а также ряд противоречий, свидетельствующих о необходимости усовершенствования для прокариот самого понятия вида. Констатируется, что до достижения условий, обеспечивающих получение результатов полногеномного секвенирования ДНК прокариот в масштабах, обеспечивающих наполнение соответствующих баз данных, достаточное для реализации принципов геномной таксономии микробов, наиболее корректным остается полифазный подход с сочетанием традиционных молекулярно-генетических тестов с хемотаксономическими, физиологическими и культуральными свойствами исследуемых изолятов.

## **Полярные прокариоты в фонде Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ)**

*Щербакова В.А.*

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

Полярные области занимают большие территории на Земле и являются местом обитания микроорганизмов, устойчивых к холоду. В России первые данные о микрофлоре Арктики были опубликованы Севериным и Исаченко еще в начале 20 века. Однако только с конца прошлого века в холодных экосистемах осуществляются исследования прокариотных сообществ как методами не связанными с культивированием, так и путем выделения и дальнейшей характеристики микроорганизмов, адаптированных к низким температурам. В последнее время интерес российских ученых к микроорганизмам полярного происхождения связан с поиском штаммов с неизвестными свойствами, полезными для биотехнологии. Цель настоящего исследования состояла в анализе бактерий и архей, выделенных из экосистем полярных областей и хранящихся в ВКМ.

Анализ электронной базы данных ВКМ показал, что в открытом доступе находится 67 холодоустойчивых штаммов прокариот полярного происхождения. Среди них наиболее широко представлены бактерии филумов *Firmicutes* (42 %), *Proteobacteria* (31 %) и *Actinobacteria* (19 %). Филумы *Planctomyces* и *Spirochaetes* представлены по одному виду, каждый. 5 % фонда полярных прокариот составляют археи филума *Euryarchaeota*. Большая часть этих прокариот выделена из многолетнемерзлых грунтов и криопэгов. Для десяти

психроактивных бактерий и архей секвенированы полные геномы. Изучение геномов, и эксперименты с культурами полярных микроорганизмов позволило обнаружить перспективных продуцентов холодоактивных липаз и эстераз (*Psychrobacter* spp.), а также антифризных белков (*Clostridium tagluense* ВКМ В- 2369).

Крайне недостаточная изученность микробного разнообразия важных для России арктических экосистем диктует необходимость дальнейшего расширения этой части фонда ВКМ. Выделение и характеристика прокариот из постоянно холодных мест обитания с уникальными свойствами откроет новые перспективы для развития биотехнологий производства холодоактивных ферментов для пищевой и химической промышленности, расширит возможность переработки отходов в умеренном и холодном климате, а также позволит оценить сроки криоконсервации микроорганизмов в природных условиях.

Работа поддержана грантом РФФИ 15-04-08612 и грантом Федерального агентства научных организаций для фундаментальных исследований в ИБФМ РАН № 01201350918.

## Биоразрушение строительных конструкций, индуцируемое микромицетами

Яковлева Г.Ю.<sup>1</sup>, Халмурадова П.А., Сагадеев Е.В.<sup>2</sup>, Строганов В.Ф.<sup>2</sup>, Ильинская О.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, yakovleva\_galina@mail.ru

<sup>2</sup>Казанский государственный архитектурно-строительный университет, Казань

Из всех видов коррозии строительных материалов биокоррозия является наименее изученной, что препятствует разработке комплекса эффективных защитных мероприятий. Причинами биоповреждений являются три основных процесса: механический, ассимиляционный (строительные материалы как источником питания и энергии микроорганизмов) и диссимиляционный (взаимодействие материалов с агрессивными метаболитами). Проведенное исследование направлено на оценку уровня биоповреждений конструкционных материалов (высокопрочный бетон, ВПБ), широко применяемых в практике строительства; определение их прочностных характеристик после воздействия микромицетов; а также анализу метаболической активности повреждающих микромицетов, связанной как с индукцией биокоррозии, так и с последствиями деятельности грибов-биодеструкторов для окружающей среды и здоровья человека. Для анализа было выбрано 15 наиболее часто встречающихся на бетонных перекрытиях зданий микроскопических грибов, 9 из которых принадлежали к роду *Penicillium* и 6 – *Aspergillus*. Все исследуемые изоляты способны синтезировать щавелевую кислоту. Яблочная кислота определялась у 14 микромицетов (93%), уксусная – у 10 (67%), лимонная – у 9 (60%), молочная – у 5 (33%) и винная – у 2 (13%) изолятов. При сравнении щавелевой и лимонной кислот было показано, что щавелевая кислота, контактируя с поверхностью бетона, образует оксалат кальция, малорастворимый в воде и образующий на поверхности защитную пленку, которая способствует сохранению структуры бетона и замедлению образования микротрещин. Установлено, что лимонная кислота является более агрессивной по отношению к ВПБ, поэтому для оценки биостойкости были выбраны микромицеты, в наибольшем количестве синтезирующие лимонную кислоту.

Образцы ВПБ были изготовлены в виде балок размером 160×40×40 мм на основе портландцементов М400 ЦЕМ II/A-II 32,5 Н и М500 ЦЕМ I 42,5 Н с кварцевым песком. При инокуляции спорами грибов на 5 сутки наблюдали рост микроорганизмов, причем по сравнению с *Penicillium* рост *Aspergillus* был интенсивнее, что подтверждает факт его принадлежности к г-стратегам. Биостойкость образцов, измеренная по коэффициенту химической стойкости на изгиб и сжатие, характеризующему изменение прочностных характеристик до и после 28 суток экспозиции с микромицетами, снизились на 1-3%, что свидетельствуют об отсутствии существенных изменений в бетоне. Электронная микроскопия не выявила индуцированных микромицетами механических повреждений, однако трещины на поверхности бетона были заполнены скоплениями мицелия, не наблюдаемого в контрольных образцах. Элементный анализ показал, что грибное поражение ВПБ сопровождается вымыванием ионов кальция: его содержание снизилось в 1.5 раза. Полученные результаты свидетельствуют, что определение прочности ВПБ по ГОСТ в течение 28 суток отражает начальные этапы биоповреждений, а методология испытаний нуждается в определенной коррекции.

## Экофизиологические особенности бактериальных комплексов кишечника диплопод различных трофических групп

Якушев А. В.

Факультет почвоведения МГУ, г. Москва, a\_yakushev84@mail.ru

Двупарноногие многоножки - многочисленные почвенные сапрофагами, вместе с кишечным бактериальным комплексом (БК) снабжают почву – ферментами, гумусом и почвенными агрегатами; растения – минеральными элементами питания. Возможно, экофизиологические особенности кишечного БК определяют их пищевую специализацию. Цель: экофизиологическая характеристика кишечных БК многоножек с различной пищевой специализацией. Задачи: сравнить гидролитические БК корма, кишечника, суточных экскрементов; классифицировать БК методом главных компонент (ГК). Изучались: полифаг умеренных широт *Cylindroiulus caeruleocinctus*, и тропические (джунгли Вьетнама, Кат-Тьен) подстилочные сапрофаги *Enghoffosoma anchoriforme*, *Desmoxytes cattienensis*, полифаг *Trigoniulus corallinus.*, *Orthomorpha sp.1*, сапроксилофаг *Nedyopus dawydoffiae* и сапрофитофаг *Thyropigus carli*. Корм отчищался от старых экскрементов за сутки до получения суточных экскрементов. Экофизиологическая характеристика БК: изучение его физиологического разнообразия, физиологического состояния и экологической стратегии его членов, определялась комплексным структурно-функциональным методом. Суспензию образцов вносили в жидкие питательные среды с разноступенными животными, микробными и растительными полимерами. Рост определяли по оптической плотности и описывался моделью, а её параметры (например, урожай) полагались аналогичными природному сообществу. Анализ урожая (прироста бактерий на грамм полимера) методом ГК установил 3 закономерности. Больше ГК1-меньше среднеарифметический урожай на всех полимерах - меньше физиологическое разнообразие гидролитического БК. Больше ГК2 - больше разность урожая на труднодоступных полимерах (кератин, хитин, целлюлоза, агароза) и на запасных (крахмал и инулин), отражает трофическую специализацию БК. Больше ГК2 - больше физиологическое разнообразие разлагателей труднодоступных полимеров. БК диплопод отличается наибольшим урожаем -наибольшим физиологическим разнообразием гидролитических БК и специализируется на труднодоступных полимерах. Физиологическое разнообразие в кишечнике *S. caeruleocinctus* больше, других многоножек, из-за выраженной полифагии и необходимости разнообразия БК. Отличается от остальных БК сапроксилофага *N. dawydoffiae*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 17-74-10209.

### Секция: Метаболизм и геномика микроорганизмов

#### Скрининг генов синтеза бактериоцинов среди культур *Enterococcus* spp.

Абаимова А.А., Теймуразов М.Г., Светоч Э.А., Фурсова Н.К.

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, info@obolensk.org

Цель – ПЦР-скрининг генов синтеза бактериоцинов коллекции штаммов *Enterococcus* spp., выделенных в 2006 - 2017 гг., исследование их антагонистической активности против тест-культур *Listeria monocytogenes* 19111, *Staphylococcus aureus* 6538, *E. faecium* 2318, *E. faecium* 700221.

Исследованы 252 штамма *Enterococcus* spp., выделенные из комбикорма (n=1), помета и органов телят (n=12), органов свиней (n=2), пищевых продуктов (n=2), клинического материала (n=28), от пчел (n=1), из органов промышленной птицы (n=203) из 46 регионов РФ, а также из образцов почвы, полученных из Республики Гвинея (n=3). ПЦР-скрининг генов *enterocin A* (*entA*), *entB*, *entQ*, *entP*, *entL50A*, *ent50B* и *mundicinKS* (*munKS*) выполнен с использованием праймеров, описанных de Vuyst et al. (2003), Cintas et al. (1998) и Henning et al. (2015). Антагонистическую активность исследовали диффузным методом блоков.

Видовая идентификация 252 штаммов *Enterococcus* spp. с помощью прибора MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия) позволила идентифицировать *E. faecalis* (46,0% штаммов), *E. faecium* (23,4%), *E. gallinarum* (13,0%), *E. cecorum* (6,0%), *E. hirae* (4,4%), *E. avium* (2,4%), *E. durans* (2,0%), *E. casseiflavus* (1,6%), *E. mundii* (0,4%), *E. italicus* (0,4%) и *E. uberis* (0,4%).

У 1 из 3 штаммов *Enterococcus* spp., несущих ген *entL50A*, выявлены зоны ингибирования роста тест-штаммов (энтерококков) с  $d=13$  мм. У 4 из 18 штаммов, несущих ген *entA*, зоны ингибирования роста тест-штаммов (энтерококков и листерий) составили  $d=11-15$  мм. У штамма *E. mundii* с геном *munkS* -  $d=22$  мм, у штамма *E. faecalis* 76 с генами *entQ* и *entP* -  $d=13$  мм. У 7 из 12 штаммов, несущих гены *entA* и *entB* зафиксированы зоны подавления  $d=11-17$  мм. У 5 штаммов, несущих гены *entQ*, *entP*, *entL50A* и *entL50B* зона подавления листерий и энтерококков составила  $d=15-17$  мм, а также выявлена активность против тест-штамма *S. Aureus* 6538 с  $d=8-9$  мм. Антагонистической активности не выявлено в штаммах, несущих гены *entB* ( $n=2$ ), *entP* ( $n=1$ ), *entL50B* ( $n=3$ ), *entL50A* и *entL50B* ( $n=3$ ).

Таким образом, наибольшая противолистерийная и противоэнтерококковая активность выявлена у штаммов *Enterococcus* spp. с генами *munkS*, *entA+entB*, а также кластером генов *entQ+entP+entL50A+entL50B*, обладающих дополнительно антистафилококковой активностью.

*Работа выполнена в рамках НИР №049 Роспотребнадзора.*

## Полногеномный сиквенс и метиломный анализ пресноводной бесцветной серобактерии “*Thioflexothrix psekupsi*” D3

Белоусова Е.В.<sup>1</sup>, Орлова М.В.<sup>1</sup>, Фоменков А.И.<sup>2</sup>, Грабович М.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Воронежский Государственный Университет, Воронеж

<sup>2</sup>New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, maryorl@mail.ru

Был получен полногеномный сиквенс представителя нового рода семейства *Beggiatoaceae* – “*Thioflexothrix psekupsi*” gen.nov. sp.nov., который является облигатным микроаэробом и литоавтотрофом. Данный штамм образует огромное количество экзополисахаридов (ЭПС), на их синтез расходуется в 10 раз больше углерода, чем на синтез белка. Поэтому выделение и очистка высококачественной ДНК из этих бактерий - сложная задача.

Остаточные ЭПС удалялись из ДНК путем дополнительной очистки на колонках PowerClean (лаборатории MoBio, Inc, Carlsbad, CA), затем проводилась репарация с помощью PreCR, концевая репарация и лигирование с адаптерами шпилек с использованием протокола PacBio, принятого для компонентов NEB. Несколько попыток использовать ДНК-лигазу T4 для создания 2kb библиотеки SMRT-bell давали выход менее 10%. Только использование комбинации ДНК-лигазы «Fusion» и «термочувствительного» варианта протеиназы K позволило сделать 5kb библиотеку SMRT-bell с выходом около 77%. Не полностью сформированные фрагменты SMRT-bell разрезались комбинацией Экзонуклеазы III и Экзонуклеазы VII (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Качественную и количественную оценку библиотек SMRT-bell выполняли с использованием флуориметра Qubit (Invitrogen, Eugene, OR) и 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Santa Clara, CA). Две библиотеки SMRT bell (2 и 5 kb) секвенировали с использованием реактивов C2-P4 и C4-P6 на 8 и 2 SMRT-ячейках в течение 180 и 240 минут соответственно. Последовательные чтения обрабатывались, сопоставлялись и собирались по методу анализа SMRT Pacific с использованием протокола HGAP3. Результатом наилучшей сборки из 5kb библиотеки был геном размером 4 010 614 п.н., состоящий из 4 больших контигов размером 3 572 323, 247 009, 62 078 и 16 849 п.н. с 283-кратным покрытием и 21 маленького контига (4 335-5 926 п.н.) с 20-кратным покрытием. Собранные последовательности были аннотированы с помощью сервера быстрой аннотации с использованием технологии подсистем (RAST) и аннотатора прокариотических геномов NCBI (PGAP) и депонированы в DDBJ / EMBL / GenBank (MSLT00000000).

Было обнаружено 17 мотивов распознавания ДНК-метилтрансферазы. Девять из них соответствуют модификациям m6A, а семь - 4mC. Два дополнительных мотива 5mC были предсказаны на основании структуры генов метилтрансферазы и гомологии с известными метилтрансферазами. Результаты были депонированы в REBASE.



## Молекулярные маркеры нозокомиальных инфекций

Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.

ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им В.И. Разумовского» Минздрава РФ, Саратов,  
meduniv@sgmu.ru, borodulinvb@mail.ru

Ежегодно в странах Европейского союза около 25 тыс. человек умирают от инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов (Codex Alimentarius Commission, 2010). Повсеместное применение антибактериальных препаратов для лечения заболеваний различной этиологии способствует селекции и диссеминации антибиотикорезистентных микроорганизмов, что приводит к увеличению случаев гнойно-септических заболеваний.

Одним из факторов, ухудшающих результаты лечения данной группы пациентов, является лекарственная резистентность возбудителей (Рахимов Б.М., Коровин О.А., 2013).

С целью совершенствования микробиологического мониторинга нозокомиальных инфекций в лечебно-профилактических учреждениях рационально использовать не только выявление антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов и проведение их микробиологического, биохимического и серологического исследований, но также выделение и идентификацию плазмидных ДНК, содержащихся в этих штаммах.

Впервые в условиях различных клинических стационаров города Саратова выделены и исследованы плазмидные ДНК из условнопатогенных грамотрицательных и грамположительных бактериальных штаммов, которые обнаруживаются у больных, находившихся на длительном лечении.

В настоящей работе впервые исследована молекулярная масса плазмидных ДНК, выделенных из клинических штаммов различных стационаров: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella cristallitica*, *E.coli* и др. и сделан рестрикционный анализ некоторых из них.

Для выделения плазмидных ДНК из клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов использовались методики Birnboim-Doli и Kado-Liu. Для выделения плазмидных ДНК из клинических штаммов *Staphylococcus aureus* использовались методики Bhaduri-Demchick и Townsend.

Изучена частота распространения условнопатогенных микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *St. aureus*, *Candida*, *Streptococcus*, *Serratia*. Во всех стационарах были обнаружены таксономические единицы *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *E. coli*, *Citrobacter*. В различных стационарах определена достоверность разницы между долями исследованной выборочной совокупности при альтернативной вариации.

Обнаружены плазмидные ДНК с различной молекулярной массой от 1 до 90 МДа. В ряде стационаров выявляются, в основном, низкомолекулярные плазмидные ДНК от 1 до 13 МДа.

## Биологическое действие наночастиц металлов в сочетании с синтетическими пептидами на клинические штаммы микроорганизмов

Бородулин В.Б., Бабушкина И.В., Бородулина Е.В., Бобылева Е.В., Лосев О.Э., Чеботарева Е.Г.

ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им В.И. Разумовского» Минздрава РФ, Саратов,  
meduniv@sgmu.ru., borodulinvb@mail.ru

В работе использовали наночастицы переходной группы металлов: никеля и меди (ТУ 1733-056-00209013-2008), синтезированные на плазмохимическом комплексе Саратовского филиала ФГУП РФ «Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (ФГУП РФ ГНЦ ГНИИХТЭОС г. Москва). Химический состав поверхности наночастиц металлов определяли при помощи сканирующего Оже-микроскопа SAM PHI-4300 (PC-Service, Германия). Точные размеры наночастиц металлов определяли на сканирующем электронном микроскопе «TescanMira II LMU» (Tescan, Чехия) и трансмиссионном электронном микроскопе «LIBRA 120» (CarlZeiss, Jena, Германия).

Изучение антибактериальной активности наночастиц металлов проводили в соответствии с МУК 1.2.2634-10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза». Микроорганизмы идентифицировали на микробиологическом анализаторе BD BBL™ Crystal™ AutoReader (Becton Dickinson, США) с применением панелей Crystal™ Enteric/NonfermenterID Kit (Becton Dickinson, США), Crystal™ Gram-PositiveID Kit (Becton Dickinson, США). Для пробоподготовки используется мини-прибор – Densi-La-Meter (Pliva-Lachema Diagnostika, Чехия), предназначенный для определения мутности разведения микроорганизмов в единицах по МакФарланду (от 0,0 до 15). 1 МакФарланд эквивалентен  $3 \cdot 10^8$  КОЕ/мл.

В работе изучено действие пяти синтетических пептидов (ILPWKWPWWPWRNH<sub>2</sub>– пептид №1, PITWPWKWKGGNH<sub>2</sub>– пептид №2, PLSWFFPRTWGKRNH<sub>2</sub>– пептид №3, FPVTWRWWKWKGNH<sub>2</sub>– пептид №4, VRRFPWWPFLRRNH<sub>2</sub>– пептид №5) на штаммы *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенных от больных с гнойными осложнениями в травматолого-ортопедическом стационаре. Обнаружена выраженная антистафилококковая активность пептида ILPWKWPWWPWRNH<sub>2</sub>.

Установлено антибактериальное действие наночастиц меди и никеля на бактериальные клетки *E.coli* и *S.aureus* при концентрации 1 мкг/мл. Наибольшую чувствительность к наночастицам меди и никеля проявляли клетки золотистого стафилококка. При сравнении активности наночастиц выявляется более высокая активность наночастиц меди по сравнению с наночастицами никеля, а также по сравнению с суммарным действием наночастиц меди и никеля на бактериальные клетки. Пептиды группы индолицидина (№1 и №4) проявляли выраженную антибактериальную активность по отношению к клеткам золотистого стафилококка, в том числе вместе с наночастицами меди и никеля.

## **Влияние специфического бактериофага на везикулообразование и морфологию клеток *Yersinia pseudotuberculosis***

*Бывалов А.А., Малкова М.А., Дудина Л.Г.*

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров  
Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, byvalov@nextmail.ru

Способность к конститутивному образованию внеклеточных структур, так называемых везикул (или OMVs), установлена для многих грамотрицательных и грамположительных бактерий. С феноменом везикулообразования связывают многие функции прокариот: участие в межклеточных взаимодействиях, образовании биопленки, питании микроба, экспорте эффекторных белков к клеткам-мишеням хозяина, транспорт иных, в том числе нерастворимых веществ: липидов, ДНК, РНК и др. Показана значимость везикул в защите бактерий нескольких видов от бактериофагов, антимикробных пептидов.

Нами впервые обнаружена способность к образованию везикул бактериями *Y. pseudotuberculosis* – одного из трех патогенных для человека видов иерсиний. Активная иммунизация морских свинок препаратом везикул, выделенным из культуры *Y. pseudotuberculosis*, формирует у животных иммунитет к заражению возбудителем чумы, но не псевдотуберкулеза. Показано, что совместная инкубация указанных бактерий серотипа 1b с бактериофагом псевдотуберкулезным диагностическим производства НИПЧИ «Микроб» приводит к существенному повышению уровня везикулообразования и изменению морфологии бактерий, выращенных поверхностным и глубинным способами. Дана иммунохимическая, химическая и электронно-микроскопическая характеристика препаратов везикул.

# Исследование механизмов первичных процессов фотосинтеза в реакционных центрах пурпурных несерных бактерий: направленный мутагенез, расшифровка кристаллической структуры, оптическая спектроскопия

Васильева Л.Г.<sup>1</sup>, Фуфина Ф.Ю.<sup>1</sup>, Селиханов Г.К.<sup>2</sup>, Габдулхаков А.Г.<sup>2</sup>, Хатыпов Р.А.<sup>1</sup>, Забелин А.А.<sup>1</sup>, Шкурюпатов А.Я.<sup>1</sup>, Шувалов В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии, Пущино

<sup>2</sup>ФГБУН Институт белка, Пущино, vsyulya@mail.ru

Фотосинтез относится к глобальным биологическим процессам, поддерживающим жизнь на планете Земля. Фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурных несерных бактерий – это мембранный пигмент-белковый комплекс, который относится к тому же типу РЦ, что и фотосистема 2 растений, но более просто устроен и стабилен. РЦ *Rba. sphaeroides* состоит из трех белковых субъединиц (L, M и H) и десяти кофакторов, образующих две пространственно симметричные ветви (А и В). Первичный донор электронов, димер Р, состоит из двух экситонно-сопряженных молекул бактериохлорофилла (БХл) Р<sub>А</sub> и Р<sub>В</sub> и является общим для обеих ветвей. Каждая из ветвей содержит также мономерные ВChl (В<sub>А</sub> или В<sub>В</sub>), бактериофеофитины (ВРheo) (Н<sub>А</sub> или Н<sub>В</sub>) и хиноны (Q<sub>А</sub> или Q<sub>В</sub>). Квантовый выход первичного процесса разделения зарядов в РЦ близок к единице при всех температурах. Такая высочайшая эффективность фотобиологического процесса достигается путем тонкой регулировки свойств кофакторов через их взаимодействия друг с другом и с окружающим белком. Физико-химические механизмы первичных процессов фотосинтеза в РЦ пурпурных несерных бактерий и фотосистеме 2 растений на данный момент недостаточно исследованы и представляют интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и для создания искусственных преобразователей световой энергии.

Фотофизические и окислительно-восстановительные свойства бактериохлорофиллов РЦ в значительной степени определяются их белковым окружением за счет образования нековалентных связей: координационных, водородных, электростатических и более слабых взаимодействий. С помощью сайт-направленного мутагенеза нами получен ряд мутантных РЦ, в которых изменены взаимодействия бактериохлорофиллов и белка. Изучены спектральные свойства РЦ, пигментный состав, получена кристаллическая структура, исследованы процессы фотохимического разделения зарядов.

*Работа поддержана грантами МКБ, РФФИ и ВНИИ 4771.2014.4.*

## Транскриптомные, протеомные и ультраструктурные перестройки в процессе онтогенеза базидиомицета *Lentinus edodes*

Ветчинкина Е.П.<sup>1\*</sup>, Купряшина М.А.<sup>1</sup>, Губаев Р.Ф.<sup>2,3</sup>, Горшков В.Ю.<sup>2,3</sup>, Гапа Л.М.<sup>2,3</sup>, Гоголева Н.Е.<sup>2,3</sup>, Агеева М.В.<sup>2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>2,3</sup>, Никитина В.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>2</sup>ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань

<sup>3</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, \*elenavetrus@yandex.ru

Морфогенез базидиомицетов, смена форм и стадий развития – это многоуровневый динамичный процесс, происходящий на внутриклеточном и межклеточном уровне в процессе жизненного цикла или под воздействием различных внешних факторов, предполагающий молекулярно-генетические, физиологические, ультраструктурные изменения и клеточную дифференцировку.

С использованием платформы Illumina HiSeq 2500 было проведено секвенирование транскриптомов *Lentinus edodes*. Анализ транскриптомных профилей на разных стадиях морфогенеза базидиомицета выявил гены экспрессирующиеся дифференциально. Установлено, что в коричневой мицелиальной пленке по сравнению с непигментированным мицелием дифференциально экспрессируются 10216 генов; при этом экспрессия 5166 генов активируется,

а 5050 – репрессируется. На генеративных стадиях развития относительно непигментированного мицелия дифэкспрессирующихся генов – в примордиях – 5395 (активируются – 2775, репрессируются – 2620); в плодовых телах – 11201 генов (активируются – 5567, репрессируются – 5634). С использованием ПЦР-анализа обратных транскриптов в реальном времени установлено, что при переходе от вегетативной стадии развития к генеративной, активируется экспрессия генов, кодирующих ферменты фенолоксидазного комплекса, хитиназы, глюканы, а также специфического фактора транскрипции. Особенно это характерно для коричневой мицелиальной пленки, стадии предшествующей плодоношению. Выявлена максимальная активность функционально значимых белков с фенолоксидазной и лектиновой активностью, а также изменение белкового профиля и появление дополнительных лакказ, тирозиназ и лектинов, характерных только для этой стадии морфогенеза. В процессе онтогенеза наблюдаются ультраструктурные перестройки внутри клеток и цитодифференцировка грибного мицелия. Существенные изменения касались строения клеточной стенки, которая является важной системой, определяющей направление морфогенетического развития базидиальных грибов.

Изучение транскрипционной активности генов, связанных с регуляцией роста и ультраструктурных изменений, выявление специфичных генов и белков-маркеров морфогенетических процессов, позволяет приблизиться к пониманию механизмов связанных с цитодифференцировкой и инициацией образования морфогенных структур у высших грибов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-02926\_А).*

### **Особенности системы секреции III типа российских эпидемических штаммов *Burkholderia cenocepacia* ST709 и *Achromobacter ruhlandii* ST36**

*Воронина О.Л., Кунда М.С., Шарапова Н.Е., Гинцбург А.Л.*

ФГБУ “Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Министерства здравоохранения РФ, Москва  
lv550@gmail.com

*Введение.* Система секреции III типа (Т3SS), открытая в 1990-х, позволяет патогенным микроорганизмам модулировать иммунный ответ и жизнеспособность клеток организма-хозяина посредством впрыскиваемых в клетки эффекторов. В альвеолах больных муковисцидозом в состоянии гипервоспаления, опосредованного мутацией в гене CFTR, кодирующем белок, формирующий хлорный канал, дополнительное воздействие на клеточное звено иммунитета при бактериальной инфекции приводит к обострению воспаления в легких и снижению функции дыхания. Особую опасность представляют эпидемические штаммы бета протеобактерий *Burkholderia cenocepacia* ST709 (Bcn) и *Achromobacter ruhlandii* ST36 (Aruh), Т3SS которых не изучена. Целью настоящей работы был поиск генов, кодирующих компоненты Т3SS, а также эффекторов Т3SS *B. cenocepacia* ST709 и *A. ruhlandii* ST36.

*Материалы и методы.* Секвенирование геномов Bcn и Aruh проводили на платформе 454 Roche, аннотирование и биоинформационный анализ - в специализированных программах. Геномы зарегистрировали в GenBank (Accession numbers: Bcn\_chr1 CP020599, Bcn\_chr2 CP020600, Bcn\_chr3 CP020600; Aruh CP017433)

*Результаты.* Сравнение геномов Bcn и *B. cenocepacia* J2315 одного клонального комплекса позволило определить на второй хромосоме Bcn область 31385 п.н., включающую несколько оперонов, кодирующих компоненты Т3SS семейства Hrc-Hrp 2. Поиск аналогов в геноме Aruh выявил протяженный участок 23920 п.н., отвечающий за Т3SS и отдельно расположенный ген белка VirB1. Сходство между белками Т3SS Bcn и Aruh составило 28-57%.

Поиск эффекторов Т3SS с помощью сервера EffectiveDB (<http://www.effectors.org/>) обнаружил 733 и 570 кандидатных белков в протеомах Bcn и Aruh, соответственно. Определение субклеточной локализации, а также наличия coiled-coil доменов в белках сократило количество кандидатов до 88 и 81, соответственно.

MxxY мотив, обеспечивающий взаимодействие с фосфоинозитид-3-киназой, был найден у 13 белков Bcn и 9 белков Aruh, показав у проанализированных эпидемических штаммов

высокий уровень регуляторов толл-подобных рецепторов, NF-kB и MAPK, которые, в свою очередь, контролируют врожденный иммунный ответ.

*Выводы.* Анализ геномов эпидемических штаммов *B. cenocepacia* ST709 и *A. ruhlandii* ST36 подтвердил их опасность, обнаружив T3SS, а также большое количество кандидатных эффекторов, в том числе, потенциальных регуляторов компонентов системы врожденного иммунитета.

## Новые геномные детерминанты дыхательного метаболизма у экстремофильных архей

Гаврилов<sup>1\*</sup> С.Н., Слободкин<sup>1</sup> А.И., Сорокин<sup>1</sup> Д.Ю., Елизаров<sup>1</sup> И.М., Марданов<sup>2</sup> А.В., Гольшина<sup>3</sup> О.В., Тоцаков<sup>4</sup> С.В., Кубланов<sup>1,4</sup> И.В.

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского и <sup>2</sup>Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>3</sup>Университет Бангора, Гуинет, Великобритания; <sup>4</sup>БФУ им. И. Канта, Калининград  
\*sngavrilov@gmail.com

Археи – один из двух доменов жизни, восходящих к последнему общему предку всех прокариот (LUCA). Археи широко распространены во многих экотопах, а в экстремальных местах обитания они зачастую доминируют. В современной биосфере именно археи способны существовать на физико-химической границе жизни – при 121-122°C (Kashefi & Lovley. Science. 2003, Takai et al. PNAS. 2008), pH около 0 (Schleper et al. IJSB. 1996), экстремальной солёности свыше 250 г/л (Andrei et al. FEMS Microbiol. Lett. 2012). Таким образом, экстремофильные археи могут обладать как наиболее древними, так и наиболее устойчивыми формами ферментов, детерминирующих ключевые процессы клеточного метаболизма.

В нашей работе рассмотрены новые детерминанты анаэробного и аэробного дыхания, обнаруженные в геномах различных экстремофильных архей, а именно: мультигеновые оксидоредуктазы гипертермофильных железоредукторов родов *Geoglobus* и *Pyrobaculum*, молибдоптеринозные полисульфидредуктазы экстремального галофила *Halanaeroarchaeum sulfurireducens*, кислородредуктазы гиперацидофила *Cuniculiplasma divulgatum* и его предполагаемого наноархейного симбионта. В частности, нам впервые удалось обнаружить гены поверхностных мультигеновых цитохромов *c* у архей. Несколько новых оксидоредуктаз этого класса было выявлено в геномах *P. ferrireducens*, *P. arsenaticum* 2319x2 и облигатного железоредуктора *G. activorans*. Первые две археи содержали гомологи железоредуктаз мезофильных бактерий, тогда как в последнем случае цитохромы не имели охарактеризованных гомологов, но их взаимодействие с нерастворимым оксидом Fe(III) было нами подтверждено биохимически. В геноме *H. sulfurireducens* было выявлено 3 молибдоптеринозные оксидоредуктазы, обуславливающих уникальный для архей процесс восстановления полисульфида с ацетатом в качестве донора электронов. Реконструкция филогении этих ферментов выявила, что они относятся к глубокой ветви полисульфид/тиосульфатредуктаз, функция генов была подтверждена на уровне транскрипции. В геномах двух разных штаммов *C. divulgatum* были обнаружены гены медных оксидаз типа A1, анализ их филогении и геномного окружения позволил выделить эти кислородредуктазы в отдельный кластер, наиболее близкий к предковой форме всех современных медных оксидаз A-типа у аэробных прокариот. Анализ генома предполагаемого симбионта *C. divulgatum* – некультивируемой наноархеи “*Candidatus Mancarchaeum acidiphilum*”, отнесённой к суперфилуму ‘DPANN’, показал, что единственной детерминантой энергетического метаболизма у этого организма может служить цитохром *bd*-оксидаза, причём наиболее вероятным источником генов и восстановленных хинонов для этого фермента является клетка-хозяин.

Очевидно, что геномный анализ раскрывает огромный потенциал метаболического разнообразия экстремофильных архей, однако является только первой частью большого спектра исследований, включающих мульти-омные подходы и анализ метаболизма этих микроорганизмов на уровне *in vitro* и *in situ*.

# Особенности анаэробного функционирования цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного шунта у штаммов *Escherichia coli* дефицитных по основным путям брожения

Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, [gulevich@genetika.ru](mailto:gulevich@genetika.ru)

Эффективный биосинтез восстановленных промышленно значимых соединений предполагают соблюдение условий анаэробноа. Однако, эффективная анаэробная конверсия субстрата в продукт, сопряженная с окислением НАДН, исключает возможность анаэробного роста клеток. Это определяет целесообразность накопления биомассы штамма-продуцента в условиях аэрации. Совокупность этих требований обуславливает предпочтительное использование факультативно анаэробных бактерий в качестве продуцентов промышленно значимых химикатов. Традиционным объектом для создания продуцентов полезных метаболитов служит факультативно анаэробная бактерия *Escherichia coli*. Среди биохимических путей *E. coli* особенный интерес с практической точки зрения представляет цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), чьи интермедиаты могут служить предшественниками в искусственных путях биосинтеза химикатов с высокой добавленной стоимостью.

Нами исследованы особенности анаэробного функционирования ЦТК и глиоксилатного шунта (ГШ) в штаммах *E. coli* с модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы, и инактивированными путями брожения, которые в общем случае рассматриваются как конкурентные по отношению к биосинтезу целевых веществ. Принято считать, что у подобных штаммов *E. coli* функционирование ЦТК тесно связано с активностью ГШ. Установлено, что оксидативная ветвь ЦТК в таких штаммах не функциональна в условиях анаэробноа и не способна обеспечить формирование изоцитрата, субстрата первой реакции ГШ. Последующая реакция ГШ катализируется, как минимум, малат синтазой G метаболизма гликолата, а формирование ключевого предшественника, ацетил-КоА, в достаточной степени обеспечивается базальной активностью пируватдегидрогеназы, фермента аэробного метаболизма. Внутриклеточная генерация CO<sub>2</sub> в результате оксидативного декарбоксилирования пировиноградной кислоты под действием пируватдегидрогеназы недостаточна для эффективного карбоксилирования фосфоенолпирувата и последующего протекания реакций восстановительной ветви ЦТК, тогда как доступность внеклеточного CO<sub>2</sub> стимулирует соответствующие процессы. При этом, окисление НАДН в восстановительной ветви ЦТК может протекать с участием как мено- так и убихинол-зависимых ферментов.

Результаты демонстрируют потенциал метаболической инженерии для исследования особенностей метаболизма множественно модифицированных рекомбинантных штаммов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-10389.

## Искусственная регуляция экспрессии генов белков нитрогеназного комплекса ризобий

Гуменко Р.С., Владимирова А.А., Саргалиева Г.М., Симахина А., Баймиев А.Х.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, [baymiev@anrb.ru](mailto:baymiev@anrb.ru)

Изучение генов азотфиксации у свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов позволило установить сходства и различия в их структурно-функциональной организации. Транскрипция *nif* генов активируется продуктом гена *nifA*. Интересным является тот факт, что за активацию всей системы азотфиксации как у свободноживущих, так и у симбиотических азотфиксаторов отвечает продукт всего лишь одного гена *nifA*. Это дает возможность искусственно изменять его регуляцию и, по сути, изменять азотфиксирующий статус микроорганизма.

У ризобий, в отличие от свободноживущих азотфиксаторов, регуляция экспрессии *сут*-генов осуществляется не только внешними факторами (в основном, кислородом), но и растением-хозяином. Следовательно, искусственное изменение регуляции гена *nifA*, придаст им

способность фиксировать азот *ex planta*, что существенно расширит границы применения клубеньковых бактерий в качестве биоудобрений.

Целью данной работы было создание штаммов клубеньковых бактерий, способных к фиксации азота в свободноживущем состоянии. Нами были созданы конструкции, содержащие гены *nifA* под управлением промотора *ParaBAD*. За основу была взята плазмида *pJN105*. Для того, чтобы удостовериться что промотор работает в штаммах ризобий нами параллельно была создана подобная же конструкция, где вместо целевого гена был вставлен репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. При трансформации данной конструкцией ризобий образовывались зелено окрашенные клоны бактерий, что доказывает функциональность промотора в анализируемых бактериях. Поскольку регуляция азотфиксации у разных родов клубеньковых бактерий имеют свои особенности, были получены экспрессирующие конструкции с генами *nifA* бактерий рода *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Sinorhizobium*. Полученные после трансформации конструкциями рекомбинантные бактерии родов *Rhizobium*, *Mesorhizobium* и *Sinorhizobium* были испытаны на их способность к фиксации азота в свободноживущем состоянии. Известно, что процесс азотфиксации у клубеньковых бактерий ингибируется кислородом. Чтобы исключить это негативное воздействие, нами были поставлены опыты по исследованию азотфиксации исследуемых рекомбинантных клонов как в аэрофильных, так и в микроаэрофильных условиях. Для этого воздух с опытных емкостей был вытеснен азотом. Было показано, что рекомбинантные клоны стали способны к незначительной фиксации азота. Причем в микроаэрофильных условиях уровень фиксации 2-3 раза выше, чем в аэрофильных. Таким образом, можно предположить, что искусственная наработка регуляторного белка NifA дает возможность придания ризобиям азотфиксирующей активности в свободноживущем состоянии.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00278 мол\_a и №17-44-020201 p\_a.*

## **Зачем бактериям протеализинподобные протеазы?**

*Демидюк И.В., Чухонцева К.Н., Костров С.В.*

Институт молекулярной генетики РАН, Москва, duk@img.ras.ru

Протеализинподобные протеазы (ППП) – группа пептидаз, относящихся к семейству термолизина. Ферменты этой группы широко распространены у эубактерий и наиболее часто встречаются у актино- и протеобактерий. Кроме того, ППП обнаружены у некоторых архей и грибов. Биологические функции ППП практически не изучены. В то же время для отдельных ферментов гамма-протеобактерий получены данные, которые указывают на то, что ППП вовлечены во взаимодействие бактерий с высшими организмами и в патогенез. Так, по-видимому, ППП участвуют в проникновении бактерий в клетки млекопитающих, могут подавлять противобактериальную защиту насекомых, а также являются факторами, вовлеченными в разрушение бактериями растительных тканей.

Изучение прототипа группы – протеализина из *Serratia proteamaculans* – позволило нам получить новые данные о функционировании ППП. Анализ бактериальных геномов продемонстрировал, что гены ППП входят в состав оперона. Кроме протеазы оперон кодирует небольшой консервативный белок с неизвестной функцией. В ходе исследований этого белка было установлено, что он является эффективным ингибитором ППП и, по-видимому, имеет внутриклеточную локализацию. Так как ранее на модели протеализина было показано, что ППП синтезируются и накапливаются в клетках в виде неактивного предшественника, а активируются лишь после выхода из клетки, можно предположить, что ингибитор необходим для подавления активности ППП, которые попадают в бактериальную клетку извне.

Тандем протеаза-ингибитор напоминает пары токсин-иммунный белок, типичные для систем, участвующих в межбактериальной конкуренции, таких, например, как система секреции типа VI или система контактного ингибирования роста. Это позволяет выдвинуть гипотезу о вовлеченности ППП не только во взаимодействия бактерий с высшими организмами, но и в конкурентную борьбу бактерий. Таким образом, ППП, по-видимому, важны для выживания бактерий в различных экологических нишах.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-04-01048.*

## Субстрат и хелатор: участие ксилана в процессе восстановления нерастворимых соединений трехвалентного железа

Елизаров И.М.<sup>1</sup>, Лопатин С.А.<sup>2</sup>, Заюлина К.С.<sup>1</sup>, Кубланов И.В.<sup>1</sup>, Гаврилов С.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского

<sup>2</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, ivan.elizarov@gmail.com

Ксилан является широко распространенным биополимером растительного происхождения, составляющим значительную часть растительного опада, являясь основным компонентом гемицеллюлоз. В данной работе мы описываем новый механизм использования ксилана не только в качестве источника углерода и энергии, но и в качестве селективного хелатора, облегчающего восстановление нерастворимых соединений трехвалентного железа у гипертермофильной археи.

Объект наших исследований, *Pyrobaculum arsenaticum* 2319x2, был выделен из *in situ* накопительной культуры с ксиланом и ферригидритом (аморфным оксидом железа-III) из обмелевшего термального ручья на острове Кунашир. На дне ручья наблюдалось значительное количество растительного опада и магнетитового песка, содержащего оксид Fe(III).

*P. arsenaticum* 2319x2 оказался способен устойчиво расти с использованием ксилана в качестве единственного углеродного и энергетического субстрата, однако рост данного микроорганизма на ксилане был возможен исключительно в присутствии внешнего акцептора электронов (тиосульфата, серы, селената, арсената, ферригидрита, серы), в то время как рост на белковых субстратах, таких как дрожжевой экстракт, триптон и пептон, наблюдался и в отсутствие внешнего акцептора электронов в результате брожения. Следует отметить, что для представителей рода *Pyrobaculum* ранее не был показан рост на полисахаридах.

Нами было также установлено, что при росте с ферригидритом *P. arsenaticum* 2319x2 способен использовать ксилан в качестве избирательного хелатора нерастворимых соединений Fe(II). При этом продукт железоредукции удаляется из зоны реакции восстановления ферригидрита, протекающей в твердой фазе. Таким образом, нами было показано, что ксилан может одновременно служить не только энергетическим субстратом, но и медиатором железоредукции, облегчающим процесс анаэробного дыхания. Это физиологическое свойство имеет важное экологическое значение для *P. arsenaticum*, позволяя ему сопрягать деградацию полисахаридов с восстановлением труднодоступного акцептора электронов (оксида Fe(III)).

Учитывая распространённость процессов железоредукции в наземных горячих источниках, богатых растительными остатками, механизм использования полисахаридных хелаторов железа в анаэробных дыхательных процессах может играть существенную роль в функционировании термофильных осадочных микробных сообществ.

## Реконструкция катаболизма углеводов термофильного представителя планктомицетов *Thermogutta terrifontis* с использованием геномного и транскриптомного подходов

Ельченинов А.Г.<sup>1</sup>, Menzel P.<sup>2</sup>, Gudbersdottir S.R.<sup>2</sup>, Krogh A.<sup>2</sup>, Бонч-Осмоловская Е.А.<sup>1</sup>,  
Кубланов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

<sup>2</sup>University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, el.alexander92@yandex.ru <mailto:el.alexander92@yandex.ru>

Бактерия *Thermogutta terrifontis* стала первым культивируемым термофильным представителем филума *Planctomycetes* (1). Как и все планктомицеты, выделенные к настоящему времени в чистые культуры, *T. terrifontis* обладает способностью использовать различные углеводы в качестве источника углерода и энергии.

Геном *T. terrifontis* был определен с применением высокопроизводительного секвенирования на базе платформы Illumina MiSeq и собран в хромосому. Ранее было показано, что *T. terrifontis* растет на следующем спектре углеводов: глюкоза, ксилоза, манноза, галактоза, трегалоза, сахароза, целлобиоза, крахмал, пектин, ксилан и ксантановая камедь. Мы провели *in silico* реконструкцию катаболизма углеводов *T. terrifontis*, уделяя особое внимание пути



разложения ксантановой камеди (КК) поскольку а) этот субстрат, по-видимому, является селективным для планктомицетов и б) механизмы разложения КК мало изучены. При анализе генома нам удалось обнаружить более 100 генов гликозидаз, 13 генов полисахаридлиаз и 3 гена карбогидратэстераз, а также многочисленные гены гликозил-трансфераз. Всего было обнаружено почти 200 генов т.н. CAZymes из 52 семейств. Их наличие обуславливает способность данного микроорганизма расти на широком спектре олиго- и полисахаридов. Моносахариды утилизируются в ходе реакций гликолиза и пентозо-фосфатного пути. Были обнаружены все гены, кодирующие ферменты гликолиза, и все гены, кодирующие белки, участвующие в модифицированном пентозо-фосфатном пути, характеризующимся отсутствием трансальдолазы. Пируват, образующийся в результате гликолиза, поступает в ЦТК. *T. terrifontis* обладает способностью к аэробному или анаэробному дыханию в присутствии кислорода или нитрата, соответственно. Последнее свойство детерминируется нитратредуктазой Nag и нитритредуктазой Nrf, гены которых также были выявлены в геноме данного микроорганизма. В том случае, если в среде нет акцептора электронов, эта бактерия может бродить, образуя ацетат, лактат и водород. Как анаэробное дыхание, так и брожение являются крайне нетипичными свойствами для планктомицетов.

Транскриптом *T. terrifontis* был получен при культивировании клеток с КК или трегалозой. Транскриптомный анализ дополнил геномную реконструкцию центрального метаболизма сахаров. Помимо этого, с помощью сочетания геномного и транскриптомного анализа был реконструирован путь разложения ксантановой камеди и предложены генетические детерминанты, ответственные за этот процесс.

1- Slobodkina G.B., Kovaleva O.L., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Kolganova T.V., Novikov A.A., van Heerden E., Bonch-Osmolovskaya E.A., 2015. *Thermogutta terrifontis* gen. nov., sp. nov. and *Thermogutta hypogea* sp. nov., thermophilic anaerobic representatives of the phylum *Planctomycetes*.

## Гипертермофильные археи-гидролитики из горячих источников Кунашира и Чили

Заюлина К.С., Гаврилов С.Н., Бонч-Осмоловская Е.А., Кубланов И.В.

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской Академии наук, институт Микробиологи им. С.Н. Виноградского, Москва,  
zauylinakc@yandex.ru

Большинство гипертермофильных гетеротрофных архей способны расти на пептидных субстратах, но в значительно меньшей степени известно об археях, способных разлагать полисахариды, а также усваивать моно- и дисахариды. Олиго- и полисахариды часто присутствуют в естественных местах обитания гипертермофильных архей: в наземных горячих источниках преобладают остатки высших растений (целлюлоза, ксилан, ксилоглюкан, арабинан, глюкоманнан и др.), а в морских экосистемах - остатки водорослей и беспозвоночных (альгинат, ламинарин, лихенан, хитин). Помимо этого, некоторые олиго- и полисахариды синтезируются самими бактериями и археями. Таким образом, в горячих источниках есть субстраты для полисахаридолитиков, а учитывая то, что в гипертермофильных условиях ( $T > 80^{\circ}\text{C}$ ) археи доминируют, то среди них должны быть и деструкторы, способные разлагать все выше перечисленные соединения.

Из проб, отобранных из гидротермальных источников Кунашира и Чили, были поставлены накопительные культуры на широком спектре полисахаридов в гипертермофильных условиях (при  $T$  от  $80^{\circ}$  до  $93^{\circ}\text{C}$ ). Из накопительных культур были выделены чистые культуры, которые по результатам анализа последовательности гена 16S рРНК были определены как *Thermococcus* sp. 2319x1, *Pyrobaculum arsenaticum* sp. 2319x2, *Thermosphaera aggregans* sp. 3507, *Thermophilum uzonense* sp. 3507LT, *Pyrobaculum aerophilum* sp. 3524. Исследование субстратной специфичности данных микроорганизмов на полисахаридах выявило их рост на таких сложных углеводах как ксилан, аморфная целлюлоза, альфа-целлюлоза, лихенан, ксилоглюкан, пуллулан, хитин, альгинат, крахмал и др. Во фракциях белков, связанных с поверхностью клеток, были выявлены ксиланазные, хитиназные, амилазные и целлюлазные активности. Геномы двух штаммов *Thermococcus* sp. 2319x1 и *Pyrobaculum* sp. 2319x2 были отсеквенированы с применением высокопроизводительного секвенирования на базе платформы Illumina (2319x1 на базе Illumina HiSeq, 2319x2. – Illumina

Miseq) и собраны до единичной хромосомы (2319x1) и 17 контигов (2319x2). Среди 18-ти гликозидаз штамма *Thermococcus* sp. 2319x1 была выявлена и охарактеризована одна мультидоменная и мультиспецифичная целлюлаза (Gavrilov et al., 2016), а также реконструированы пути утилизации гексоз, но не пентоз. Работа по анализу генома *Pyrobaculum* sp. 2319x2 началась недавно, было обнаружено 10 генов, кодирующих гликозидазы, анализ специфичности которых будет проведен в ближайшее время.

## **Новый взгляд на механизм автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> через восстановительный цикл трикарбоновых кислот. Функция цитратсинтазы в автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> у зелёных серных бактерий**

*Ивановский Р.Н., Лебедева Н.В.*

Кафедра микробиологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва  
m guru@mail.ru

Изучение роли цитратсинтазы у аноксигенных зелёных серных бактерий позволило предположить, что система реакций автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> состоит из двух частей - восстановительного цикла трикарбоновых кислот (ВЦТК), в котором происходит синтез ацетил-КоА, и нециклической ветви. Она начинается с синтеза цитрата в цитратсинтазной реакции, в которой ацетил-КоА, синтезированный в ВЦТК, конденсируется с оксалоацетатом - продуктом карбоксилирования второй молекулы ацетил-КоА. Далее, цитрат окисляется до 2-оксоглутарата. В нециклической ветви осуществляется синтез субстратов (пирувата, оксалоацетата и 2-оксоглутарата), используемых в биосинтетических целях. Таким образом, процессы автотрофной ассимиляции CO<sub>2</sub> и синтез центральных метаболитических предшественников оказываются разделены: ВЦТК используется для синтеза ацетил-КоА, дальнейший метаболизм которого происходит через нециклическую систему реакций.

## **Микробиом кишечника пациентов с диагностированным колоректальным раком**

*Ильинская О.Н.<sup>1</sup>, Нгуен тхи Нга<sup>1</sup>, Гатауллин И.Г.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Ilinskaya\_kfu@mail.ru

<sup>2</sup>Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань, lgizg@list.ru

Большинство исследований микробиоты кишечника человека проводят на фекальных образцах, что имеет ряд ограничений для определения понятия нормофлоры, связанных не только с нестабильным паттерном микробиома в ответ на вариабельность питания, но и с невозможностью выявления микроорганизмов, плотно ассоциированных с кишечным эпителием. Современный анализ биоптатов эпителия кишечника дает более четкую картину, свидетельствуя, что развитие колоректального рака (КР) сопряжено с дисбалансом микробиоты: увеличением числа *Proteobacteria* и уменьшением числа *Bacteroidetes* у больных колоректальным раком по сравнению со здоровыми добровольцами. Выявлена проонкогенная роль энтеротоксигенных групп бактерий *Escherichia-Schigella* и *Bacteroides fragilis*.

В настоящей работе проанализирован метагеном отобранных во время операционного вмешательства биоптатов трансформированного и здорового эпителия пациентов с КР. Установлено, что у больных КР преобладают филы *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, при отсутствии качественных различий структуры сообществ нормального и малигнизированного эпителия. Показано, что количественно трансформированный эпителий характеризуется повышенной долей бактерий *Gemella* sp. (4,3%), *Fusobacterium* sp. (3,3%) *Leptotrichia* sp. (11,1%) и пониженным содержанием *Bacteroides* sp. (19,1%), *Ruminococcaceae* (8,1%), *Sutterella* sp. (6,4%).

Охарактеризованы физиологические особенности культивируемых факультативно-аэробных гетеротрофных микроорганизмов, плотно ассоциированных с поврежденной и нормальной эпителиальной тканью кишечника пациентов. Не обнаружено различий в уровне

гемолитической активности и спектре патогенетических онкомаркеров: из 15 генетических детерминант, контролирующие адгезивную, гемолитическую и токсигенную активности, гены токсинов канцерогенного действия, колибактина и цитотоксического некротизирующего фактора 1, выявлены у половины всех изолятов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*. В то же время у бактерий с малигнезированного эпителия выявлена повышенная чувствительность к ципрофлоксацину и гентамицину, а у бактерий с нормального эпителия – к хлорамфениколу и эритромицину. Заслуживает особого внимания факт обнаружения у *E. coli* и *B. pumilus* с малигнезированного эпителия повышенного уровня активности секретируемых РНКаз. Гуанилпредпочитающая РНКазы *B. pumilus* выделена нами из культуральной жидкости продуцента, установлена ее димерная структура и охарактеризовано селективное противоопухолевое действие по отношению к клеткам, экспрессирующим определенные онкогены. Показано прямое взаимодействие фермента с онкогеном K-RAS, приводящее к блокированию MAPK/ERK сигнального пути. Наличие внеклеточных РНКаз у резидентных кишечных бактерий позволяет предположить, что последние могут участвовать в элиминации опухолевых клеток за счет продукции этих ферментов.

## Открытие способности микоплазм к образованию цист

Клемяшов И.В.

Московский технологический университет (МИРЭА), Москва, klemashov@mirea.ru

В результате исследований последних лет выявлены такие свойства *M.*, как способность влиять на кроветворение, что приводит к лейкопении, индуцировать иммуносупрессию и аутоиммунные реакции организма, вызывать необратимые хромосомные нарушения и тератогенный эффект при воздействии на половые клетки, *M. pneumoniae* – возбудитель атипичной пневмонии. Ряд исследователей считает весьма вероятным, что носители *M.* представляют собой группу повышенного риска по развитию онкологического процесса. Сравнительно недавно стало известно что *M.* способны блокировать действие стауроспорина – индуктора апоптоза, т.е. *M.* превращают клетки на которых паразитируют в клетки с онкологическими признаками. У мужчин проявлением микоплазменной инфекции является уретрит, баланит и баланопостит, простатит, эпидидимит, цистит. Предполагается участие *M.* в формировании плацентарной недостаточности, что приводит к внутриутробной гибели плода или рождению детей с низкой массой тела. Учитывая, что микоплазменная инфекция в настоящее время занимает одно из ведущих мест среди инфекций, передающихся половым путем, а также большое количество осложнений при отсутствии лечения, все больше исследователей приходят к выводу, что микоплазмоз – это инфекционное заболевание, которое требует лечения.

Во время лабораторных исследований на ядрышках клеток линии НСТ-116 (карцинома) было замечено неоднократное прорастание её микоплазмами (за несколько лет). Культуру клеток культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина при 37.0 С, 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере. На проросшей *M.* культуре НСТ-116 были получены фазовые изображения (топограммы) *in vitro* на когерентном фазовом микроскопе Эйрискан (разработан в МИРЭА) с интенсивностью излучения когерентного источника He-Ne лазера 0,037 мВт/мм<sup>2</sup> в области исследуемого биообъекта. Обнаружены внутриклеточные включения, определён их геометрический размер  $d \approx 350-600$  нм и оптические параметры – фазовая высота  $\Delta h$  (ФВ)  $\approx 40$  нм от уровня цитоплазмы, рефрактерность  $\Delta n \approx \Delta h/d \approx 0,13$ , относительный фазовый объём  $optW \approx \Delta n W \approx 0,0018$  мкм<sup>3</sup>. Лечение проросшей *M.* культуры проводили путём добавления Plasmocin с конечной концентрацией 25 мкг/мл в течение 7 суток. Для изучения ультраструктуры клетки промывали буфером Хэнкса, открепляли от подложки, осаждали кратковременным центрифугированием и фиксировали 2,5 % раствором глутаральдегида. Трансмиссивная электронная микроскопия до и после лечения выполнялась по стандартной методике на микроскопе JEM-1200 EX-II (Япония). При внимательном рассмотрении ультраструктуры клеток НСТ-116 после лечения на одном из снимков была обнаружена полностью сохранившаяся *M. hct-cist* сферической формы. Хорошо различима ультраструктура. Внешний размер 590 нм и центральное тело – 412 нм. Известно, что *M.* имеют только одну внешнюю мембрану более эластичную чем клеточная стенка

обычных клеток. Поэтому однозначен вывод, что мы видим цисту микоплазмы с толщиной защитной оболочки толщиной около 90 нм. Понятно, что в состоянии цисты *M.* могла бы в дальнейшем переждать неблагоприятные условия (Plasmocin) и затем вновь прорости, начать делиться и вновь заразить культуру клеток.

Данное открытие меняет взгляд на класс *M.* и на подходы к лечению от микоплазмоза. Предстоит проверить другие виды микоплазм на цистообразование.

## **Механизмы антибактериального действия варнерина - низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков**

Коробов В.П.<sup>1,2,3</sup>, Полудова Т.В.<sup>1</sup>, Лемкина Л.М.<sup>1</sup>, Филатова Л.Б.<sup>1</sup>, Ерошенко Д.В.<sup>1</sup>, Кононова Л.И.,<sup>4</sup> Лихацкая Г.Н.

<sup>1,2,3</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, info@iegm.ru

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь,  
info@psu.ru

<sup>3</sup>Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь,  
rector@pstu.ru

<sup>4</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток,  
piboc@eastnet.febras.ru

Быстрое формирование устойчивости бактерий к вводимым в практику антибиотикам определяет необходимость перманентного поиска новых соединений, обладающих выраженным антибактериальным действием.

В этой связи особое внимание исследователей привлекают антибиотические свойства лантибиотиков - низкомолекулярных катионных пептидов, многолетнее практическое использование одного из них, низина, в качестве эффективного пищевого консерванта и антисептического агента не привело к появлению резистентных к нему бактерий. Основой антибактериального действия пептидов класса лантибиотиков является формирование ими в атакуемых бактериях нерегулируемых мембранных пор с последующей тотальной деструкцией бактериальных клеток.

Результаты проводимых нами в течение последних лет исследований физико-химических свойств, первичной структуры, пространственной организации и механизмов антибактериального действия низкомолекулярного катионного пептида варнерина, синтезируемого и выделяемого в среду роста бактериями *S.warneri* KL-1, позволяют рассматривать его в качестве нового представителя пептидов класса лантибиотиков.

Детектируемая использованием программы МОЕ пространственная организация структуры пептида напоминает безжалостное оружие ацтеков – бумеранг. Действительно, внесение варнерина в среду инкубации бактерий *S.cohnii* ВКМ В-3165 приводит к быстрому снижению потребления ими кислорода и их численности. Однако, расчетная скорость поглощения кислорода оставшейся частью бактериальных клеток значительно возрастает, что свидетельствует о разобщающем действии пептида, которое одновременно сопровождается быстрым выходом ионов калия в окружающую среду и, практически, полной потерей клетками АТФ, а также активацией аутолизина и выходом их в окружающую среду. Внесение пептида в свежую суспензию бактерий приводит к стремительному падению их мембранного потенциала и резкому увеличению внутриклеточной концентрации свободных радикалов. Конечным этапом разрушительного действия варнерина на бактериальные клетки является тотальная везикуляция их мембранных структур, детально выявляемая методами электронной и атомно-силовой микроскопии.

Представленные данные значительно углубляют представления о биологических свойствах и механизмах антибактериального действия низкомолекулярных пептидов семейства лантибиотиков, указывая на реальность перспектив значительного расширения их практического использования.

# Новые липолитические ферменты из библиотеки метагеномной ДНК микробного сообщества вечной мерзлоты

Крюкова М.В.<sup>1</sup>, Петровская Л.Е.<sup>2</sup>, Новотоцкая-Власова К.А.<sup>3</sup>, Крюкова Е.А.<sup>2</sup>, Ривкина Е.М.<sup>3</sup>, Долгих Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

<sup>3</sup>Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пушкино, mar-1-ya@yandex.ru

Вечная мерзлота, занимающая более 50% территории России, является средой обитания микроорганизмов, выживающих в течение геологически длительного периода времени, в условиях низких температур и низкого содержания воды, медленной диффузии минеральных и органических веществ, и других.

Известно, что большая часть микроорганизмов, населяющих экстремальные местообитания, являются некультивируемыми, в силу чего большое значение для их исследования приобретают метагеномные подходы. На основе метагеномной ДНК, выделенной из вечномерзлых грунтов, нами получены фосмидные библиотеки и проведен их скрининг на наличие липолитической активности.

Гены двух потенциальных эстераз, принадлежавших к семейству HSL, экспрессированы в *E. coli*, проведено изучение активности полученных рекомбинантных ферментов и ее зависимости от различных факторов. Установлено, что PMGL2 является эстеразой, которая активна в широком диапазоне температур, с предпочтением мезофильных условий. Максимальная активность наблюдается при температуре 45°C с *n*-нитрофенил бутиратом (С4) в качестве субстрата. Аминокислотная последовательность вблизи каталитического остатка серина S174 включает в себя новый мотив GCSAG. Температурный оптимум PMGL3 достигается при температуре 30°C, а каталитический центр включает в себя GESAG мотив. Инкубация при температуре 50°C привела к практически полной инактивации PMGL3, в то время как PMGL2 сохранил 65% активности. Оба белка обладают типичной  $\alpha/\beta$  гидролазной укладкой и образуют димеры в растворе. Детальное изучение трехмерных структур выявило несколько уникальных особенностей этих ферментов, в том числе детерминанты олигомеризации.

Работа выполнена при поддержке российского научного Фонда гранты №14-14-01115 (в части биохимических исследований) и 14-24-00172 (в части структурных исследований).

## Литические ферменты *Lysobacter* sp. XL1

Кудрякова И.В. \*, Тищенко С.В. \*\*, Габдулхаков А.Г. \*\*, Шишкова Н.А. \*\*\*,  
Цфасман И.М. \*, Васильева Н.В. \*

\*ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пушкино, vasilyevanv@rambler.ru

\*\*ФГБУН Институт белка Российской академии наук, Пушкино

\*\*\* ФГБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
Оболенск

Литические ферменты грамотрицательной бактерии *Lysobacter* sp. XL1 изучаются в ИБФМ РАН более 40 лет. На основе этих ферментов создан антимикробный препарат широкого спектра действия – лизоамидаза. Лизоамидаза обладает бактериолитической, дрожжелитической и антифунгальной активностью в отношении в т.ч. и множественноустойчивых к антибиотикам форм. Ферменты лизоамидазы подробно охарактеризованы, но, несмотря на долгую историю изучения, остается много вопросов, связанных с их топогенезом и функционированием.

В последние годы были получены новые данные об особенностях топогенеза двух гомологичных бактериолитических протеаз *Lysobacter* sp. XL1 Л1 и Л5. Оказалось, что, при наличии определенной гомологии, ферменты используют различные пути секреции в окружающее пространство: фермент Л1 секретируется посредством секреторной системы

второго типа, а фермент Л5 – с помощью внешне-мембранных везикул, образуемых клетками *Lysobacter* sp. XL1. Секреция с помощью везикул значительно расширяет литические свойства фермента Л5. В составе везикул он приобретает способность гидролизовать живые клетки различных микроорганизмов, в то время как нативный фермент таким действием не обладает. В структурном плане белки идентичны на 63%. В белке Л5 имеются два домена, особенно отличающихся от таковых у Л1. Возможно, именно эти различия обуславливают особенности топогенеза. Помимо этого, обнаружена способность белка Л5 формировать амилоиды. Такая особенность позволила объяснить участие этого белка в везикулообразовании у *Lysobacter* sp. XL1.

Везикулы, содержащие белок Л5, обладали лечебным действием в отношении стафилококкового сепсиса и сибиреязвенной болезни, смоделированных у мышей. Даже однократная инъекция везикул приводила к полному выздоровлению экспериментальных животных. Поэтому, везикулы могут быть использованы в качестве модели для конструирования антимикробных препаратов нового поколения. При изучении фосфолипидного состава мембран везикул было показано, что кардиолипид является мажорным фосфолипидом. Были получены первые образцы искусственных везикул - липосом, образованных кардиолипином и содержащих белок Л5. Показано литическое действие липосомального препарата в отношении различных бактерий, в т.ч. и множественноустойчивых форм (MRSA).

Таким образом, вновь открывшиеся особенности функционирования литических ферментов *Lysobacter* sp. XL1, способствовали развитию новых фундаментальных и прикладных направлений исследований.

## **Полифосфатазы дрожжей: свойства, функции, перспективы практического применения**

*Кулаковская Т.В.<sup>1</sup>, Андреева Н.А.<sup>1</sup>, Трилисенко Л.В.<sup>1</sup>, Рязанова Л.П.<sup>1</sup>, Думина М.В.<sup>2</sup>, Эльдаров М.А.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, [alla@ibpm.pushchino.ru](mailto:alla@ibpm.pushchino.ru)

<sup>2</sup>ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Центр «Биоинженерия», Москва

Неорганические полифосфаты и ферменты их метаболизма вовлечены в регуляцию фосфорного и энергетического обмена, а также адаптационные реакции, что обуславливает актуальность изучения этих ферментов. Полифосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* PPN1 и PPX1 кодируются негомологичными генами, различаются по субстратной специфичности, локализации в клетке и роли в метаболизме полифосфатов. PPX1 является экзополифосфатазой, отщепляющей Pi с конца полимерной цепи полифосфатов. Фермент катализирует гидролиз аденозинтетрафосфата и гуанозинтетрафосфата до АТФ и ГТФ, а также цАМФ до АМФ, что свидетельствует в пользу его участия в обмене сигнальных соединений. PPN1 в присутствии ионов кобальта проявляет экзополифосфатазную активность, а в присутствии ионов магния – эндополифосфатазную активность, фрагментируя высокополимерные полифосфаты. Этот фермент катализирует отщепление фосфата от dATP, что позволяет предполагать его участие в регуляции уровня предшественников ДНК. Роль PPX1 и PPN1 в обмене полифосфатов неодинакова. С помощью штаммов-суперпродуцентов этих ферментов показано, что увеличение уровня PPN1 приводит к значительному снижению содержания полифосфатов, а увеличение уровня PPX1 не влияет на их содержание.

Поскольку неорганические полифосфаты играют значительную роль в развитии костной ткани, в свертывании крови и воспалительных процессах, а также широко используются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве, становится актуальной задача специфического анализа этих соединений, причем зачастую в присутствии избытка пирофосфата и ортофосфата. PPX1 и PPN1 не гидролизуют пирофосфат, их активность не подавляется избытком ортофосфата, а гидролитическая активность по отношению к полифосфатам в оптимальных условиях на один-два порядка выше, чем с другими субстратами, перечисленными выше. Нами разработаны эффективные методики очистки этих белков из

клеток дрожжей-суперпродуцентов, проведены опыты по анализу содержания полифосфатов в различных биологических образцах, включая пищевые продукты, что позволяет рассматривать экзополифосфатазы в качестве перспективного аналитического инструмента.

*Исследования поддержаны грантом РФФИ 17-04-00822.*

## **Роль фенолоксидаз в различных аспектах жизнедеятельности микроорганизмов**

*Купряшина М.А.\*, Ветчинкина Е.П., Никитина В.Е.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов  
\*kupryashina\_m@mail.ru

Фенолоксидазы – лакказы, тирозиназы и Mn-пероксидазы – внеклеточные неспецифические окислительные ферменты, уникальные кинетические характеристики которых позволяют им участвовать в процессах деградации многих полициклических соединений. Впервые ферменты этой группы были обнаружены у грибов белой гнили, на сегодняшний день фенолоксидазы изучены у многих базидиомицетов, почвенных сапротрофов, фитопатогенов, аскомицетов, а также бактерий. Роль лакказ и Mn-пероксидаз в основном связывают с разрушением лигниноподобных соединений, а тирозиназ с пигментацией, однако в ходе ряда исследований нам удалось установить, что данные ферменты имеют и другие функциональные значения.

У бактерии рода *Azospirillum* фенолоксидазы играют немаловажную роль при становлении ассоциативных взаимоотношений с растением-хозяином. Наряду с тем, что лакказы и Mn-пероксидазы опосредуют проникающую способность бактерий, благодаря лигнинолитической функции, данные ферменты являются протекторами при становлении симбиотических отношений, за счет разрушения токсичных вторичных метаболитов растения-хозяина.

Защитная функция фенолоксидаз полифункциональна. На гомогенных препаратах ферментов было показано, что именно лакказы и Mn-пероксидазы участвуют в биоредукции токсичных соединений металлов с образованием наночастиц, что отражается в способности азоспирилл и некоторых базидиомицетов к биосинтезу наночастиц золота и серебра.

Установлено, что Mn-пероксидазы, лакказы и тирозиназы функционально значимы в морфогенезе базидиомицетов. Лакказы при нанесении на поверхность растущего вегетативного мицелия инициируют образование плодовых тел. Переход от вегетативной стадии развития к образованию базидиом сопровождался увеличением продукции Mn-пероксидаз, лакказ и тирозиназ. В зависимости от стадии морфогенеза отмечалась перестройка в составе фенолоксидазного комплекса.

Подводя итог, хочется отметить, что несмотря на вековую историю, интерес к изучению фенолоксилирующих ферментов не ослабевает, а лишь расширяет представления о них.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-02926\_A.*

## **РП сигнальные белки фотосинтезирующих микроорганизмов: от молекулярных механизмов до клеточных функций**

*Лапина Т.В.<sup>1</sup>, Минаева Е.С.<sup>1</sup>, Форчхаммер К.<sup>2</sup>, Ермилова Е.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Университет Эберхарда и Карла Тюбингена, Германия, e.ermilova@spbu.ru

Одно из фундаментальных свойств микроорганизмов состоит в их способности быстро адаптироваться к изменениям в окружающей среде, что обеспечивается в значительной степени эффективной работой систем рецепции, передачи и интеграции экзо- и эндогенных сигналов. Сигнальные белки семейства РП, выявленные у бактерий, архей и растений, представляют древнюю сигнальную систему, которая сохранила консервативность в процессе эволюции для координации реакций ассимиляции азота в ответ на состояние метаболизма. Белки РП функционируют за счет белок-белковых взаимодействий, контролируя широкий спектр мишеней в клетке, включающих ферменты, транскрипционные факторы и белки-транспортёры.



У гетеротрофных прокариот контролируемые РП мишени вовлечены в процессы метаболизма азота и углерода, в связи с чем эти белки рассматривают как центральные регуляторы метаболизма. У РП-белков фотосинтезирующих организмов (цианобактерий и представителей археопластид) появились дополнительные клеточные мишени: наиболее консервативной функцией белков РП у них является контроль биосинтеза аргинина за счет регуляции фермента N-ацетилглютаматкиназы (NAGK). Нами впервые для модельных представителей фотосинтезирующих эукариотических микроорганизмов - *Chlamydomonas reinhardtii* и *Chlorella variabilis* - выявлены и охарактеризованы белки из семейства РП. Проведенный анализ кристаллической структуры Р<sub>II</sub> *Chlamydomonas reinhardtii* (CrP<sub>II</sub>) выявил на С-конце участок, который был обозначен нами как Q-петля. По нашим данным, глутамин связывается с Q-петлей, изменяя в результате конформацию CrP<sub>II</sub> на активную, в которой белок взаимодействует и активирует NAGK, обеспечивая таким образом контроль формирования орнитина, аргинина и запасания азота в целом. Наши данные предполагают, что в эволюции хлоропластов зеленых водорослей от цианобактериальных предков, появился механизм рецепции глутамина с помощью Р<sub>II</sub>-сигнальных трансдукторов за счет небольшого С-концевого удлинения. Выявление первого рецептора глутамина в хлоропластах открывает дополнительные перспективы для более глубокого понимания метаболизма азота у фотосинтезирующих организмов. Кроме того, подходы функциональной протеомики позволили нам получить данные, указывающие на то, что спектр белков, которые регулируются РП-трансдукторами у фотосинтезирующих микроорганизмов (цианобактерий и одноклеточных зеленых водорослей), шире, чем было известно. На основе анализа полученных в работе штаммов со сниженными уровнями CrP<sub>II</sub> охарактеризованы новые процессы, которые контролируются у фотосинтезирующих микроорганизмов белками из семейства РП (поддержано РФФИ, грант №15-54-12370).

## Анализ геномов штаммов *Klebsiella pneumoniae*, несущих гены карбапенемазы NDM-1

Лев А.И.<sup>1</sup>, Кисличкина А.А.<sup>1</sup>, Воложанцев Н.В.<sup>1</sup>, Асташкин Е.И.<sup>1</sup>, Ершова О.Н.<sup>2</sup>, Александрова И.А.<sup>2</sup>, Богун А.Г.<sup>1</sup>, Фурсова Н.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, пос. Оболенск, info@obolensk.org

<sup>2</sup>ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ, Москва, info@nsi.ru

Целью данной работы был анализ полных геномов двух штаммов *Klebsiella pneumoniae*, несущих ген эпидемически значимой карбапенемазы NDM-1.

Штаммы *K. pneumoniae* КРВ-417/16 и КРВ-1470/16, выделенные из эндотрахеального аспирата двух пациентов нейрохирургического ОРИТ 28.03.16 г. и 05.09.16 г., соответственно, идентифицировали с помощью MALDI-TOF Biotyper (Германия) и Vitek-2 (Франция). Полногеномное секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq (США) с помощью наборов Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (США). Единичные Контиги собирали с помощью программ Newbler Assembler 2.9 (США) и SPAdes 3.9.0. (Россия). Для анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей использовали программы и web-ресурсы MLST Pasteur (Франция), NCBI Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Mauve (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>), Lasergene 11 (США).

Общее количество контигов полных геномов штаммов *K. pneumoniae* КРВ-417/16 и КРВ-1470/16 при сборке в программе Newbler Assembler 2.9 составило 159 и 186, в программе SPAdes 3.9.0. – 115 и 110, с покрытием 36 и 43, соответственно. Общая длина контигов для штамма КРВ-417/16 составила 5625359 п.н., для штамма КРВ-1470/16 – 5637851 п.н. Оба штамма характеризовались сиквенс-типом ST147. Ранее в изучаемых штаммах методом ПЦР были детектированы гены *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, а в штамме КРВ-417/16 дополнительно ген *bla*<sub>OXA-48</sub>. С помощью анализа полных геномов выявлены также гены устойчивости к бета-лактамам (*bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub>), аминогликозидам (*aadA1*, *aadA2*, *armA*, *aac(6)Ib-cr*), фторхинолонам (*oqxA*, *oqxB*, *fosA*), макролидам (*msrE*, *mphE*), фениколам (*catB4*), сульфаниламидам (*sul1*) и триметоприму (*dfrA12*). В геноме штамма



КРВ-1470/16 присутствовали гены *aac(3)-IIa*, *strA*, *strB*, *qnrS1*, *catA2* и *sul2*. Большое количество генетических детерминант резистентности локализованы на плазмидных репликациях разных групп несовместимости: IncFII, IncFIB, IncHI1B и IncL/M. На последней локализован ген карбапенемазы *bla*<sub>OXA-48</sub>. Стоит отметить, что первый случай выделения штамма *K. pneumoniae* с геном *bla*<sub>NDM</sub> в изучаемом ОРИТ был детектирован в марте 2016 г. С сентября по декабрь 2016 г. были выделены от пяти пациентов еще 7 штаммов *K. pneumoniae* с *bla*<sub>NDM-1</sub>, которые отличались от первого штамма отсутствием гена *bla*<sub>OXA-48</sub>.

*Работа выполнена в рамках проекта РНФ Грант 15-15-00058.*

## **Внесение мутаций в потенциальные сайты димеризации биназы**

*Лисевич И.М., Ульянова В.В.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, lisevich.ira@mail.ru

Димеризация играет важную роль в функционировании многих белков. Биологические эффекты некоторых эукариотических рибонуклеаз (РНказы BS, РНказы L) обусловлены образованием димеров. Значение димеризации прокариотической РНказы - биназы *Bacillus pumilus* - до конца не ясно. Димеризация может влиять на эффективность связывания фермента с поверхностными структурами клеток, а также приводить к увеличению цитотоксичности из-за повышения РНказной активности. Предполагается, что в естественных условиях, в отличие от кристаллов, не один, а оба активных центра фермента могут быть открыты. Об этом говорит большая РНказная активность димера по сравнению с мономером, зарегистрированная методом зимографии, а также результаты теоретических расчетов, согласно которым наиболее высокая константа скорости ассоциации димеров биназы в растворе характерна для модели с двумя открытыми активными центрами.

Для устранения накопившихся противоречий и экспериментального подтверждения теоретической модели образования димеров биназы в настоящей работе методом сайт-направленного мутагенеза была внесена мутация в потенциальный сайт димеризации белка: Arg15 был заменен на нейтральный аланин. Выбор аргинина в качестве мишени обусловлен тем, что он образует немалое число контактов, обеспечивающих наибольшую энергетическую стабильность димеров. Аланин не вносит электростатических или стерических эффектов и не нарушает конформацию основной цепи. В реакции инвертированной ПЦР с использованием пары праймеров, в которой прямой праймер содержал замену CGC-GCC в гене биназы, была амплифицирована плазида pML5. После фосфорилирования 5'-концов ПЦР фрагментов, они были лигированы с образованием кольцевой ДНК, которой трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* JM109. Для подтверждения наличия замены Arg15Ala в гене биназы фрагменты полученных плазмид были секвенированы по Сэнгеру в обоих направлениях. Континги выравнивали и сравнивали с нативным геном биназы. В результате было установлено, что плазмиды содержали искомую замену.

Таким образом, была получена плазида, несущая ген биназы с мутацией Arg15Ala, которая будет использована в дальнейшем как ДНК-матрица для клонирования мутантного гена биназы в экспрессионный вектор с целью изучения физических и структурных особенностей мутантного белка и экспериментального обоснования теоретически построенной модели димеров биназы.

## **Влияние ингибитора протонной помпы карбонилцианид-м-хлорофенилгидразона (СССР) на восстановление селенита бактерией *Azospirillum brasilense* Sp7**

*Мамченкова П.В., Камнев А.А., Тугарова А.В.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Саратов  
norgeadress@gmail.com

Микробные окислительно-восстановительные реакции играют важную роль в биогеохимических трансформациях соединений селена. Восстановление оксоанионов Se<sup>IV/VI</sup> до

нерастворимого  $\text{Se}^0$  бактериями может включать реакции с тиоловыми группами глутатиона и белков (Painter-type reactions), сидерофорами; участие диссимиляторных мембранных редуктаз и т.д. Восстановление оксоанионов Se бактериями часто приводит к образованию наночастиц элементарного селена  $\text{Se}^0$  ( $\text{SeH}_4$ ), представляющих интерес для “зеленой химии”. Ранее было показано, что ризобактерии *Azospirillum brasilense* могут восстанавливать  $\text{Se}^{\text{IV}}\text{O}_3^{2-}$  с формированием  $\text{SeH}_4$  [1].

В данной работе мы изучали восстановление селенита бактерией *A. brasilense* (штамм Sp7) при действии ингибитора протонной помпы – карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразона (CCCP). Используемые концентрации CCCP 5–50  $\mu\text{M}$ , как было показано ранее, полностью ингибируют метаболизм *A. brasilense* Sp245 [2]. Бактерии были выращены до конца логарифмической фазы роста (18 ч); отмытые клетки были инкубированы в физиологическом растворе в присутствии 10–25  $\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (32°C, 24 ч). Без CCCP *A. brasilense* Sp7 восстанавливал селенит с образованием экстраклеточных сферических  $\text{SeH}_4$  со средним диаметром 80–100 нм, наблюдаемых методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). После обработки CCCP восстановление происходило иначе: наблюдались включения игловидных кристаллов  $\text{Se}^0$  внутри клеток. Гипотетически механизм восстановления селенита может включать следующие этапы: 1) транспорт селенит-ионов в клетку; 2) внутриклеточное восстановление с образованием зародышей  $\text{Se}^0$ ; 3) транспорт зародышей  $\text{Se}^0$  из клетки; 4) внеклеточная “сборка” Se H<sub>4</sub>. По нашим данным, CCCP блокирует, как минимум, третий этап этого процесса, и элементарный селен накапливается внутри клетки в виде кристаллов. Таким образом, мы продемонстрировали участие протон-зависимого транспорта в одном из этапов восстановления  $\text{SeO}_3^{2-}$ : транспорте зародышей  $\text{Se}^0$  из клетки.

*Работа поддержана грантом РФФИ 16-08-01302-а.*

## Компьютерная сборка метаболических путей

*Минкевич И.Г.*

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

Метаболизм живых клеток на уровне отдельных биохимических реакций в настоящее время хорошо изучен, и этот уровень знаний постоянно расширяется в область необычных субстратов, экстремальных условий жизни и новых видов микроорганизмов. Сложной проблемой является вопрос о том, как свойства отдельных реакций влияют на физиологические закономерности, на поведение метаболизма в целом и его более или менее крупных частей — метаболических путей. Это важно для расчёта характеристик стехиометрии и энергетики метаболизма, для анализа возможности той или иной реакции быть узким местом метаболизма, для конструирования генно-модифицированных клеток. В решении этой проблемы большое значение имеют не только экспериментальные, но и теоретические методы.

Важной задачей является построение метаболических путей, преобразующих заданный субстрат в заданный продукт, из отдельных реакций. До сих пор это осуществлялось «вручную». Такой способ встречает серьёзные трудности, когда метаболический путь содержит много реакций и имеет разветвлённый характер. Данная работа посвящена разработке математических основ и соответствующего пакета программ для компьютерного решения данной задачи, то есть, выбора тех реакций из имеющейся базы данных, которые осуществляют данное преобразование.

Задача формулируется так. Записывается система стехиометрических уравнений для всех реакций из используемой в компьютере базы данных. Задаются входящий поток субстрата и выходящий поток продукта метаболического пути. Неизвестными являются потоки через все реакции. Если значения каких-то потоков будут найдены равными нулю, то эти реакции в искомом пути не участвуют. Совокупность ненулевых потоков указывает, какие реакции реально участвуют в этом пути. Эти уравнения линейные. Такая система была бы легко решаемой, если бы не две её особенности. Первая трудность связана с тем, что число уравнений обычно не равно числу неизвестных. Вторая трудность, гораздо более серьёзная, происходит из того, что часть реакций являются необратимыми. Последнее в математическом плане выглядит как существование ограничительных плоскостей в пространстве, измерениями которого

являются скорости всех реакций используемой базы данных; значения скоростей по одну из сторон каждой такой плоскости являются недопустимыми.

Эти трудности, обойти которые не удалось другим исследователям, были нами преодолены, соответствующая математическая основа и реализующий её программный пакет разработаны. Для исследования математических свойств задачи, отладки программ и испытания компьютерного пакета в целом была взята относительно небольшая база данных из 96 реакций и 99 метаболитов. В этом случае задача решается за 3–6 сек. Были получены известные метаболические пути, что явилось тестом на правильность. Но даже для этой базы были найдены неожиданные варианты путей. Найдено, что для одних пар субстрат–продукт эта база данных даёт единственный вариант пути, а для других — довольно много вариантов, причём реальный путь может быть любой комбинацией из этих вариантов. Последнее означает, что в понятии метаболического пути существует элемент произвольности.

## **Выявление генных детерминант фотосистемы II у метанотрофных бактерий**

*Мирошников К.К. \*, Дедыш С.Н.*

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва  
\*infon18@gmail.com

Метанотрофные бактерии (метанотрофы) – экологически важная группа микроорганизмов, обеспечивающая биогенное окисление метана - второго по значимости парникового газа [1]. Подавляющее большинство известных метанотрофов используют исключительно C1 соединения в качестве источников углерода и энергии. Несмотря на это, недавние исследования показали присутствие в геноме облигатного метанотрофа *Methylocapsa palsarum* NE2<sup>T</sup> [2] кластера генов, обеспечивающего способность к аноксигенному фотосинтезу за счет функционирования фотосистемы II, характерной для пурпурных бактерий. Подобные кластеры генов были ранее выявлены у ряда факультативных метилотрофных бактерий рода *Methylobacterium*, населяющих филлосферу растений [3].

Так как способность метанотрофов к фототрофии до сих пор не была описана, данная работа ставила своей задачей поиск и филогенетический анализ генетических детерминант фототрофии у представителей метанотрофных бактерий, а также подбор условий их экспрессии. Исследуемый кластер включает в себя гены, кодирующие светособирающий комплекс *rufABCML*, реакционный центр *rufH*, а также гены, обеспечивающие синтез бактериохлорофилла и каротиноидов. Среди метанотрофов подобный кластер генов обнаружен у *Methylocella silvestris* BL2<sup>T</sup>, *Methylocapsa palsarum* NE2<sup>T</sup> и *Methylocystis rosea* SV97<sup>T</sup> - представителей класса *Alphaproteobacteria*, включающего многочисленных пурпурных бактерий. Эти новые данные способны внести коррективы в представления об эволюции, экологической нише и возможной метаболической пластичности метанотрофных бактерий.

## **Микробиологическая и генетическая характеристика культур *Shigella flexneri* 1b, выделенных в Калининградской области**

*Мицевич И.П., Асташкин Е.И., Карцев Н.Н., Демушев К.В., Фурсова Н.К., Светоч Э.А., Дятлов И.А.*

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk  
info@obolensk.org

*Shigella* spp. является одной из основных причин вспышечных случаев пищевой инфекции в Российской Федерации. Болезнь может протекать в тяжёлой форме и при непринятии своевременной этиотропной терапии закончиться смертью пациента. Важное значение для организации противоэпидемических мер борьбы с шигеллёзом имеет характеристика фено- и генотипических свойств возбудителя.

Цель работы – изучение микробиологических и генетических свойств *S. flexneri 1b*, выделенных при вспышке шигеллёза (дизентерии), произошедшей в 2017 году в Калининградской области.

Исследованы свойства 24 культур *S. flexneri 1b*, выделенных из фекалий больных и секционного материала умерших. Биологические свойства и антибиотикорезистентность культур определяли на приборе Vitek-2 Compact (bioMérieux), серологические – с помощью диагностических агглютинирующих сывороток. Генотипирование штаммов проводил с помощью ПЦР методом случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD-PCR) со случайными праймерами OPA-11, Wil2 и 1247. В штаммах определяли наличие генов *bla*<sub>CTXM</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHW</sub>, *bla*<sub>OXA40</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, а также интегронов класса 1 и 2, их генных кассет.

Изученные штаммы имели типичные для шигелл культурально-морфологические и биохимические свойства, 22 культуры относились к серотипу *S. flexneri 1b*, у двух культур серотип не определен. Изученные культуры *S. flexneri 1b* были устойчивы к 5 функциональным классам антибактериальных препаратов: ампицилину, ампициллин/сульбактаму, стрептомицину, тетрациклину, хлорамфениколу и триметоприм/сульфаметоксазолу. По результатам RAPD-PCR генотипирования 22 штамма отнесены к генотипу А, а два несеротипированных – к генотипу В1. Гены бета-лактамаз отсутствовали во всех 24 штаммах, однако в 22 из 24 были детектированы интегроны класса 1 и класса 2. Интегроны класса 2 содержат кассеты размером 2000 п.н. Не исключено, что именно в этих кассетах локализованы гены резистентности к перечисленным выше антибиотикам.

Таким образом, вспышка шигеллёзной инфекции в Калининградской области была вызвана множественно лекарственно устойчивыми штаммами *S. flexneri 1b*, относящимися к двум генетическим типам: доминирующему генотипу А (n=22) и генотипу В (n=2). У выделенных культур изучаются детерминанты вирулентности.

*Работа выполнена в рамках НИР №049 Роспотребнадзора.*

## **Кадаверин как предиктор микрoэкологических нарушений в вагинальном биотопе**

*Нестерова Л. Ю.<sup>2</sup>, Годовалов А. П.<sup>1</sup>, Карпунина Т. И.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, Пермь

<sup>2</sup>ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, [larisa.nesterova@bk.ru](mailto:larisa.nesterova@bk.ru)

Биогенные полиамины (БП) присутствуют в клетках всех живых организмов. В последнее время все большее внимание уделяется диаминам (путресцину, кадаверину) и их роли в регуляции межмикробных взаимодействий в микробиоте генитального тракта. Известно, что значительное количество полиаминов обнаруживается во влагалищном секрете при бактериальном вагинозе (БВ) – патологическом состоянии, обусловленном, главным образом, анаэробами. Избыточная продукция именно этих соединений служит одним из основных диагностических критериев БВ. Однако, *Escherichia coli*, которая зачастую присутствует в вагинальном биотопе либо в качестве транзитного комменсала, либо одного из резидентных ассоциантов дисбиотического сообщества, при определенных условиях также способна активно образовывать БП.

Экспериментально установлено, что синтез кадаверина клетками *E. coli* строго зависит от содержания кислорода в окружающей среде. При культивировании в аэробных условиях содержание внутриклеточного путресцина приблизительно в 2 раза превышало содержание кадаверина. При уменьшении аэрации содержание кадаверина в бактериальных клетках возрастало более чем в 10 раз, в то время как количество путресцина оставалось на одном уровне независимо от концентрации кислорода. Сходным образом менялось содержание этих поликатионов в среде культивирования. Таким образом, в подобных случаях накопление кадаверина можно расценивать как ответную реакцию на истощение кислорода из окружающей среды.

Слизистая оболочка влагалища, как составная часть микробиома человека, характеризуется широким спектром колонизирующих ее микроорганизмов и их метаболитов. При исследовании микробного и биохимического состава вагинального секрета

субфертильных женщин было обнаружено, что возрастание количества *E. coli* сопровождалось увеличением содержания кадаверина. Более того, наличие ассоциаций *E. coli* с представителями родов *Staphylococcus*, *Enterococcus* и *Candida* характеризовалось преобладанием кадаверина над путресцином. Можно предположить, что эти микроорганизмы, активно потребляя кислород, способствуют созданию в биотопе условий, в которых *E. coli* активно продуцирует кадаверин. Дефицит кислорода может, в свою очередь, способствовать развитию анаэробной, в том числе БВ-ассоциированной микрофлоры. Таким образом, при отсутствии возбудителей анаэробной инфекции, повышенное содержание кадаверина во влагалищном секрете и преобладание его над путресцином следует считать предиктором существенных микробиологических изменений, способствующих развитию бактериального вагиноза.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научных проектов р\_а 16-44-590279 и 17-44-590404.*

## **Биогенные полиамины принимают участие в регуляции Quorum sensing – зависимых процессов у бактерий**

*Нестерова Л. Ю.<sup>1,2</sup>, Ткаченко А. Г.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, [larisa.nesterova@bk.ru](mailto:larisa.nesterova@bk.ru)

В последнее время большое внимание уделяется вопросам, связанным с межклеточной коммуникацией бактерий, одним из важнейших механизмов которой является Quorum sensing (QS). Биопленкообразование, в основе которого лежит переход от планктонного образа жизни к оседлому, является одной из основных стратегий выживания микроорганизмов при действии неблагоприятных внешних факторов. С биопленкообразованием тесно связано роение – специфическая форма бактериальной подвижности, которая, наряду с формированием биопленок, регулируется посредством межклеточной коммуникации. Ранее было показано, что клеточные метаболиты полиамины (путресцин, кадаверин, спермидин и спермин), способны оказывать влияние на генную экспрессию и участвовать в адаптации бактерий к различным видам неблагоприятных воздействий.

Изучение влияния полиаминов на поверхностное роение (swarming) и свободное перемещение (swimming) бактерий показало, что присутствие в среде путресцина и спермидина, но не кадаверина значительно снижало способность *Escherichia coli* к свободному перемещению, увеличивая, при этом, способность к роению. В то же время, полиамины значительно стимулировали биопленкообразование микроорганизмов. Во всех случаях эффект был концентрационно-зависимым и сильнее проявлялся на мутанте, дефицитном по полиаминам, по сравнению с родительским штаммом *E. coli*. Таким образом, полиамины оказывают влияние на процессы перехода от свободного плавания к роению и биопленкообразованию. Предполагается, что эти поликатионы могут оказывать действие как за счет регуляции экспрессии генов, непосредственно участвующих в этих процессах, так и через их эффект на системы, осуществляющие межклеточную коммуникацию.

Изучение влияния полиаминов на функционирование системы QS 1 типа характерной для большинства грамотрицательных микроорганизмов было проведено с использованием *Chrobacterium violaceum*. Показано, что спермидин и спермин оказывали стимулирующее действие как на этапе синтеза аутоиндуктора, так и на этапе его восприятия. Сила эффекта зависела от концентрации поликатионов.

Таким образом, полиамины оказывают влияние на функционирование системы QS, действуя на процессы синтеза и восприятия аутоиндуктора, что может, по крайней мере частично, обуславливать эффект этих поликатионов на переход бактерий от планктонного образа жизни к оседлому.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта р\_а 16-44-590279 и программы УрО РАН проект 15-4-4-1.*

## Одномоментные исследования носительства генов антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2015 и 2017 гг.

Новикова Т.С.<sup>1</sup>, Лев А.И.<sup>1</sup>, Асташкин Е.И.<sup>1</sup>, Ершова О.Н.<sup>2</sup>, Фурсова Н.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск  
info@obolensk.org

<sup>2</sup>ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ, Москва,  
info@nsi.ru

**Цель.** Сравнение результатов одномоментных исследований пациентов нейрохирургического ОРИТ - чувствительности к антимикробным препаратам (АП) и распространенность генов антибиотикорезистентности в культурах грамотрицательных бактерий (ГОб).

**Материалы и методы.** Исследования проведены 29.01.15, 03.06.15, 13.11.15 и 18.04.17 гг. с участием 24, 16, 22 и 16 пациентов, соответственно. Бактериальные культуры выделяли на питательных средах ГРМ-1, Плоскирева, Эндо и Левина (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и идентифицировали на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Чувствительность к АП определяли методом микроразведений в бульоне. Гены *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *ompA*, *ompK36* и *adeR* и интегроны классов 1 и 2 определяли методом ПЦР, секвенировали и анализировали с помощью программ Vector NTI, Chromas и BLAST.

**Результаты.** Выделено 80, 43, 78 и 49 культур ГОб в ходе четырех одномоментных исследований. Идентифицировано 12 видов бактерий, в том числе *Klebsiella pneumoniae* (n=68), *Pseudomonas aeruginosa* (n=39), *Escherichia coli* (n=37), *Acinetobacter baumannii* (n=21), *Proteus mirabilis* (n=16) и другие (n=69). Показано, что большинство штаммов являются антибиотикорезистентными: к одному классу АП устойчивы 29 % штаммов, к двум – 26 %, к трем – 10 %, к четырем – 16 %, к пяти – 4 % штаммов. В полученных ГОб обнаружены гены AP (1,2,3, 4 исследования): *bla*<sub>CTX-M</sub> (24, 15, 20, 17), *bla*<sub>TEM</sub> (26, 19, 14, 11), *bla*<sub>SHV</sub> (28, 7, 15, 15), *bla*<sub>OXA</sub> (39, 12, 15, 2), интегроны класса 1 (25, 15, 23, 12) и класса 2 (7, 1, 5, 6). Все изоляты *A. baumannii* имели гены *adeR* и *bla*<sub>OXA</sub>-типа; подавляющая часть которых (93%) выделена от пациентов без ПАИВЛ. Следует отметить, что из кишечника выделена большая часть изолятов - 67%, в которых найдено 63% идентифицированных генов резистентности, причем значительное число этих культур содержали эпидемически значимые гены *bla*<sub>CTX-M</sub> и *bla*<sub>OXA-48</sub>. Отмечено в 2017 г., по сравнению с 2015 г., уменьшение носительства бактерий вида *A. baumannii* и генов резистентности *bla*<sub>OXA</sub>-типа.

**Выводы.** Проведение одномоментных обследований бактериального носительства в ОРИТ и выявление генов антибиотикорезистентности в микробиомах пациентов позволит выработать подходы к профилактике инфицирования пациентов и сдерживанию распространения антибиотикорезистентности.

*Работа выполнена в рамках НИР №049 Роспотребнадзора.*

## Метаболический потенциал *Azospirillum thiophilum* BV-S<sup>T</sup>

Орлова М.В., Грабович М.Ю.

Воронежский Государственный Университет, maryorl@mail.ru

Дiazотрофные альфапротеобактерии рода *Azospirillum* обычно являются органотрофами, хотя некоторые штаммы *Azospirillum lipoferum* способны к водородозависимому автотрофному росту. Большинство представителей данного рода являются симбионтами, обитающими в корневой системе различных растений. Всего два вида, *A. largimobile* и *A. thiophilum*, обитают в водных экосистемах. *A. thiophilum* был выделен из минерального сульфидного источника.

Для *A. thiophilum* был получен полногеномный сиквенс методом Pacific Bioscience. Геном представлен 8 кольцевыми хромосомами, общий размер которых 7.6 млн п.н., а G+C состав – 68.2%.

В геноме *A. thiophilum* содержатся все гены, кодирующие ферменты углеродного метаболизма через гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и глиоксилатный цикл. Был выявлен полный набор генов ферментов, ответственных за автотрофный рост за счет цикла Кальвина. Для подтверждения функционирования данного цикла была определена активность одного из его ключевых ферментов – фосфорibuлокиназы, а также вспомогательного фермента цикла – карбоангидразы. Было показано увеличение экспрессии гена, кодирующего второй ключевой фермент цикла – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбокxилазы, в литоавтотрофных условиях по сравнению с литогетеротрофными.

*A. thiophilum* способен к микроаэробному хемолитоавтотрофному росту в присутствии тиосульфата и молекулярного водорода. Окисление тиосульфата при литотрофном росте может осуществляться за счет функционирования Sox-комплекса и тиосульфатдегидрогеназы, гены которых были обнаружены в геноме. Также в геноме были обнаружены гены, кодирующие Ni-Fe-гидрогеназы, за счет которых осуществляется литотрофный рост на водороде.

*Azospirillum thiophilum* способен к росту на метаноле и формиате. При этом образуется CO<sub>2</sub>, который может метаболизироваться через цикл Кальвина. Также данный штамм способен к анаэробному дыханию, используя тетраионат в качестве конечного–акцептора электронов.

Такая метаболическая универсальность имеет большое значение для адаптации *A. thiophilum* к постоянно меняющимся физико-химическим условиям среды.

### Свойства лизилоксидазы *Haloterrigena turkmenica*

Пестов Н.Б., Калиновский Д.В., Ларионова Т.Д.

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН, Москва, korn@mail.ibch.ru

Горизонтальный перенос генов между дальними ветвями жизни – интереснейшее явление природы с огромным эволюционным значением. Мы изучаем структурно-функциональные особенности лизилоксидазы (LOX) – фермента, который катализирует окислительное дезаминирование различных аминов, включая остатки лизина в составе полипептидов. До недавнего времени считалось, что LOX имеется только у животных, соответственно, современные знания о биохимических свойствах и физиологических ролях ограничены LOX млекопитающих и дрозофилы. Тщательный анализ баз данных обнаруживает значительное число LOX в самых различных геномах, указывая на то, что ген LOX претерпел несколько древних событий горизонтального переноса. В результате этого (в сочетании также и с потерей генов) наблюдается причудливая картина распространения гена LOX: все животные (кроме нематод и гребневиков) имеют от одного до 5 генов, в то время как он отсутствует у растений и очень редко встречается у простейших, грибов, и археобактерий, в то время как у зубактерий встречается спорадически. Например, ген LOX обычен в мегаплазмидах актиномицетов.

Нами было проведено клонирование гена LOX галофильной археобактерии *Haloterrigena turkmenica* (прежнее наименование — *Halococcus turkmenicus*) в экспрессионный вектор для суперпродукции рекомбинантного фермента в *E. coli*. Показано, что интактная рамка считывания не производит активный фермент. Поэтому было получено несколько трункционных мутантов, в которых N-концевой предположительный сигнальный пептид был заменен на гексагистидиновую последовательность. Такие конструкции позволили осуществить успешную наработку активной LOX после очистки в денатурирующих условиях и рефолдинга. LOX *Haloterrigena turkmenica* проявляет аминоксидазную активность по отношению к самым различным первичным аминам, включая, например, D и L-лизин, а также остатки лизина в пептидах и белках. Наблюдается уникальная среди других аминоксидаз субстратная специфичность. Например, LOX *Haloterrigena turkmenica* хорошо окисляет глицин, γ-аминомасляную кислоту и таурин, что является необычной чертой. Кроме того, хорошими субстратами являются антибиотики, содержащие первичные амины, например, капреомицин, амикацин и полимиксин. Поэтому можно предположить, что LOX способна участвовать в устойчивости к некоторым антибиотикам в аэробных условиях.

# **История возникновения устойчивости бактерий к антибиотикам на основе анализа бактерий, выделенных из многолетнемерзлых отложений**

*Петрова М.А., Миндлин С.З.*

ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, petrova@img.ras.ru

Распространение множественной лекарственной устойчивости у патогенных бактерий представляет серьезную проблему для медицины и фармацевтической промышленности. Уже к концу 80-х годов 20 века, в результате интенсивного применения антибактериальных средств, штаммы, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью, практически полностью вытеснили штаммы, устойчивые только к одному виду антибиотика. Приблизительно в это же время была сформулирована гипотеза о том, что любые природные бактерии могут являться источником генов устойчивости к антибиотикам, которые благодаря горизонтальному переносу генов попадают в клинику. Самым простым способом проверить эту гипотезу представляется исследование генов антибиотикоустойчивости бактерий, выделенных из почвы и воды. Однако при таком подходе нельзя исключить возможности того, что детерминанты устойчивости к антибиотикам в современных штаммах природных бактерий фактически были заимствованы из таких вторичных источников, как комменсалы или патогены человека. Уникальную возможность для анализа биотопов «доантибиотической эпохи» и сравнения молекулярной структуры детерминант антибиотикорезистентности «древних» и современных бактерий предоставляют многолетнемерзлые отложения. Вечная мерзлота Земли из полярных регионов является уникальным природным хранилищем микроорганизмов, в котором микробные сообщества выживают в течение тысяч и миллионов лет.

В докладе обобщены результаты исследований последних лет, посвященных изучению антибиотикорезистентных бактерий, выделенных из образцов вечной мерзлоты. У «древних» природных бактерий обнаружены гены устойчивости к  $\beta$ -лактамам, стрептомицину, спектиномицину, ванкомицину, тетрациклину, сульфаниламидам уровень сходства которых с клиническими генами достигает 100%. Рассмотрена молекулярная структура плазмид древних бактерий, несущих детерминанты устойчивости к антибиотикам, в сравнении со структурой плазмид современных бактерий, и определены родственные отношения между ними.

На примерах транспозонов подгрупп Tn5393 и Tn21 рассмотрены различные механизмы формирования сложных транспозонов, содержащих одновременно несколько генов устойчивости к антибиотикам.

Приведенные данные являются убедительным доказательством происхождения как самих клинических генов устойчивости к антибиотикам, так и несущих их мобильных элементов от детерминант устойчивости природных бактерий.

## **Известные и новые анаплеротические пути, необходимые бактериям, когда ацетат является единственным источником углерода**

*Петушкова Е.П. \*, Цыганков А.А.*

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино,  
\*ekaterina-petushkova@rambler.ru

Органические кислоты и субстраты, метаболизируемые через ацетил-КоА ассимилируются через цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). ЦТК выполняет две функции: дает восстановительные эквиваленты, и, в то же время, обеспечивает углеродными предшествующими метаболитами и НАДФН биосинтетические процессы. При использовании ацетата в качестве единственного источника углерода из ЦТК происходит отток его промежуточных звеньев на биосинтетические нужды клетки. Поддержание пула щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) в ЦТК достигается с помощью глиоксилатного цикла. Известны также другие анаплеротические пути.

В ходе данной работы проведен анализ разрозненных данных об известных биохимических реакциях с точки зрения их потенциального участия в путях образования ЩУК



или предшественников ЩУК в ЦТК. Выявлены новые пути восполнения пула интермедиатов ЦТК, которые могут функционировать в прокариотических организмах. Существенно углублены представления о реакциях уже известных путей, обнаружены альтернативные последовательности некоторых участков этих путей, в том числе с ферментами, отличающимися специфичностью к энантиомерам субстратов. Разработана универсальная метаболическая схема центрального углеродного метаболизма и путей восполнения пула ЩУК в ЦТК прокариот.

Выявлено, что пути восполнения ЦТК имеют общие реакции и переменные участки. Учитывая обнаруженные закономерности, осуществлена классификация данных путей по образуемому в них метаболиту, через который происходит образование предшественников ЩУК в ЦТК. Они подразделены на 4 группы. Пути (I), в которых происходит образование глиоксилата (глиоксилатный цикл; путь с участием Рубиско в качестве оксигеназы); пути (II) – одновременно глиоксилата и пропионил-КоА (метиласпартатный, цитрамалатный циклы и этилмалонил-КоА путь); пути (III) – только пропионил-КоА (3-гидроксипропионатный цикл); пути (IV) – пирувата/фосфоенолпирувата (ПВК/ФЕП). Глиоксилат, пропионил-КоА, ПВК/ФЕП далее превращаются в интермедиаты ЦТК разными путями.

*Работа поддержана РФФИ (грант № 15-14-30007).*

## Современные представления о геноме клубеньковых бактерий

*Румянцева М.Л., Мунтян В.С., Симаров Б.В.*

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, СПб-Пушкин  
mroumiantseva@yandex.ru

Клубеньковые бактерии рода *Sinorhizobium*, являются типичными почвенными сапрофитными бактериями, формирующими облигатно экологический симбиоз с бобовыми растениями. Геном ризобий состоит из нескольких репликонов, размеров которых у различных представителей этого рода варьирует от 6,69 до 7,17 млн.п.н..

Геномы симбионтов люцерны, которые относятся к двум близкородственным видам: *S. meliloti* и *S. medicae*, – излюбленные объекты исследований молекулярных генетиков на протяжении последних десятилетий. В состав генома, как правило, входит три репликона: хромосома и две мегаплазмиды. Размер хромосомы референтного штамма *S. meliloti* Rm1021 составляет 3,65 млн.п.н., однако у природных штаммов он варьирует в пределах  $\pm 300$  т.п.н. Суммарный размер обеих мегаплазмид превосходит 2/3 размера хромосомы, что позволило рассматривать их как хромиды. В геномах природных штаммов *Sinorhizobium spp.* может присутствовать различное число дополнительных криптоических плазмид от 1 до 5 с размером от 30 до 400-600 т.п.н., функции которых остаются, по-прежнему, мало изученными.

Анализ нуклеотидных последовательностей репликонов у ряда штаммов, геномы которых секвенированы, показал наличие многочисленных IS-элементов, транспозонов. Кроме того, выявлены дубликации и делеции последовательностей различной протяженности (от 10 и более 40 т.п.н.). Анализ полногеномных последовательностей *in silico*, результатов ДНК-гибридизационного анализа с биочипами выявил факты обмена последовательностями между всеми репликонами на уровне одного генома, а также между репликонами штаммов одного или разных видов бактерий. В структуре хромосомы *S. meliloti* присутствуют акцессорные элементы – геномные острова, имеющие фаговое происхождение. Внутренняя часть островов содержит переменный набор последовательностей специфичных или уникальных для клубеньковых бактерий, а также гипотетических или уникальных чужеродных последовательностей. В островах могут присутствовать блоки генов, специфичные для клубеньковых бактерий, выделенных из различных генцентров растений-хозяев.

Многокомпонентный геном клубеньковых бактерий имеет высокую степень структурной пластичности, что, обуславливает эффективность его адаптивности к абиотическим факторам среды и определяет степень его «дополнительности» при формировании растительно-микробной симбиотической системы.

*Работа поддержана грантом РФФИ 17-16-01095.*

# Построение математических моделей метаболических сетей с использованием графовой базы данных

Рясик А.А., Орлов М.А., Ермак Т.В., Сорокин А.А.

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, arc7an@gmail.com

Задачи, связанные с пониманием и изменением процессов метаболизма актуальны во многих аспектах: создание клеток-суперпродуцентов; диагностики заболеваний; расширения фундаментальных знаний о метаболизме как отдельных микроорганизмов, так и целых сообществ.

Следовательно возникает необходимость решения таких задач на масштабах сообществ микроорганизмов — это требует создания инструмента, который позволил бы хранить огромные объемы биологических данных и информацию о их взаимосвязи, а также быстро их сортировать и производить поиск.

Поэтому целью данной работы является разработка инструмента для интеграции и автоматического построения потоковых моделей (flux models) метаболических сетей. В качестве платформы для интеграции данных о микробиоме человека используется база данных БиоГраф. БиоГраф является графовым хранилищем биологических данных, описывающих жизнедеятельность организмов с помощью больших объемов *omics*-данных о каждом организме, а также функциональных связей между этими данными.

Интеграция существующих метаболических моделей происходит путем загрузки в базу данных информации из файлов в формате SBML, которые были составлены вручную. При загрузке происходит создание реакций и функциональных связей с существующими объектам в базе данных: метаболитами, ферментами, организмами и т.д. Таким образом, модель преобразуется в графовое представление.

Построение модели представляет собой обратный процесс: выбор необходимых объектов из базы данных и объединение их в единую модель, также в формате SBML. В результате данный инструмент позволяет осуществлять сборку потоковых моделей метаболических сетей на основании ранее загруженных данных и связей между объектами, такими как подобие нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Таким образом разработанный инструмент позволяет собирать модели метаболических сетей для новых, ранее не изученных, штаммов на основании информации о гомологии белков, а также создавать модели популяций бактерий микробиома человека.

*Работа поддержана грантом РФФИ №15-07-0588915.*

## Роль сопутствующего окислительного стресса в выживании клеток *Escherichia coli*, подвергнутых действию хлорида натрия

Секацкая П. А.<sup>1,2</sup>, Ахова А. В.<sup>1</sup>, Нестерова Л. Ю.<sup>1,2</sup>, Ткаченко А. Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, larisa.nesterova@bk.ru

Окислительный стресс развивается вследствие повышения в клетках выработки активных форм кислорода (АФК) до уровня, при котором защитные механизмы клетки не способны нейтрализовать их действие. Одной из АФК является пероксид водорода, а гены защиты от вызываемого им пероксидного стресса в клетках *E. coli* объединены в *oxyR*-регулон. Известно, что в бактериальных клетках, подвергнутых неблагоприятным воздействиям, например действию антибиотиков или теплового шока, наблюдается увеличение продукции АФК.

Целью данной работы является изучение развития сопутствующего окислительного стресса в условиях повышенной осмолярности среды и его вклада в антибактериальный эффект.

Осмотический шок вызывали добавлением хлорида натрия в концентрациях, дающих

стрессовое воздействие трех разных уровней силы: слабого (количество клеток не отличалось от контроля и равнялось  $10^8$  КОЕ/мл), среднего (снижение до  $10^6$  КОЕ/мл) и сильного (снижение до  $10^3$  КОЕ/мл). Развитие окислительного стресса регистрировали по повышению уровня экспрессии гена *oxyR*. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) при высевах на LB-агар. Для нейтрализации сопутствующего пероксидного стресса и оценки, таким образом, его вклада в гибель бактериальных клеток использовали тиомочевину, которая обладает антиоксидантными свойствами. Нами было установлено, что в условиях окислительного стресса, вызванного добавлением перекиси водорода, внесение тиомочевины снижало экспрессию гена *oxyR* и значительно повышало жизнеспособность бактериальных клеток, что подтверждает ее способность нейтрализовать пероксид водорода.

В результате экспериментов было установлено, что при добавлении хлорида натрия уровень экспрессии гена *oxyR* в клетках *E. coli* возрастал. Это свидетельствует о том, что осмотический шок действительно сопровождался повышенной выработкой АФК в клетках. Добавление тиомочевины снижало экспрессию гена *oxyR*, индуцированную осмотическим шоком, до контрольного уровня. Нейтрализация сопутствующего окислительного стресса при внесении тиомочевины приводила к усилению антибактериального действия осмотического шока средней силы, но сопровождалась повышением жизнеспособности клеток, подвергнутых сильному осмотическому стрессу.

Таким образом, роль повышенной продукции АФК в условиях осмотического шока определяется силой стрессового воздействия и может заключаться как в усилении антибактериального эффекта, так и в защите от действия специфического стрессового фактора.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект №16-34-00095 мол\_а), РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта р\_а 16-44-590279 и программы УрО РАН (проект 15-4-4-1).*

## **Стрессовый ответ фитопатогенной энтеробактерии *Pectobacterium atrosepticum*SCRI1043 на дефицит азота**

Сергеева Ю.П.<sup>1</sup>, Горшков В.Ю.<sup>1,2</sup>, Даминова А.Г.<sup>2</sup>, Гоголев Ю.В.<sup>1,2</sup>, Петрова О.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, <sup>2</sup>ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, [juliasergeeva\\_94@mail.ru](mailto:juliasergeeva_94@mail.ru)

Основная часть жизненного цикла микроорганизмов проходит при воздействии разнообразных стрессовых факторов. Для выживания в этих условиях бактерии располагают механизмами направленной модификации метаболизма. На сегодняшний день описана универсальная физиологическая программа стрессового ответа у бактерий, ключевыми моментами которой являются остановка роста, лизис части популяции и формирование покоящихся бактериальных форм. Однако, в исследованиях, проведенных нами на бактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в условиях голодания по углероду, было установлено, что бактерии реализуют альтернативные стратегии адаптации в зависимости от клеточной плотности популяции и физиологического статуса клеток. Представляется вероятным, что события, происходящие при адаптации бактерий к дефициту разных элементов, например, углероду и азоту, могут различаться. Поэтому целью настоящего исследования была характеристика адаптивной программы фитопатогенной энтеробактерии *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 в условиях голодания по азоту.

Было установлено, что при дефиците азота титр культивируемых клеток в течение 3-х суток снижался с  $10^9$  кл/мл до  $10^7$  кл/мл. Клетки приобретали перекрестную устойчивость к окислительному стрессу и солевому и температурному шоку и сохраняли патогенный потенциал в отношении растения-хозяина. Экспрессия генов строгого ответа (*relA*, *spoT*) незначительно индуцировалась в ходе голодания, а уровень экспрессии гена *rpoS*, кодирующего стрессовый сигма-фактор RpoS, оставался на базовом уровне. Вероятно, RpoS-независимые механизмы могут быть вовлечены в формирование устойчивых клеточных фенотипов.

В условиях азотного голодания происходила резкая индукция экспрессии генов *nif*-регулона, контролирующего формирование функционального нитрогеназного комплекса. В то

же время происходила активация экспрессии генов *carA* и *carB*, кодирующих карбамоил фосфат синтазу. т.о., фиксированный азот, вероятно, включался в синтез пуринов/пиримидинов, поддерживая гомеостаз нуклеиновых кислот при дефиците азота.

*Работа поддержана грантом РНФ 15-14-10022.*

## **Генетические линии *Staphylococcus aureus*, ответственные за вспышки эксфолиативного дерматита, зарегистрированные в России с 2012 по 2016 гг.**

*Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Богун А.Г., Абаев И.В.*

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, пос. Оболенск, info@obolensk.org

Золотистый стафилококк - это широко распространённый микроорганизм, способный вызывать самые разные инфекции. При инфекциях кожных покровов наиболее часто выделяемым возбудителем является именно *Staphylococcus aureus*. Одной из самых тяжёлых кожных форм инфекций является эксфолиативный дерматит, который встречается, как правило, у новорождённых, отличается тяжёлым течением инфекции. Факторами, благодаря которым *S. aureus* способен вызывать клинические симптомы данной инфекции, являются эксфолиативные токсины, гены которых передаются с помощью бактериофагов или плазмид. Гены этих токсинов ассоциированы с *S. aureus* клональных комплексов (Clonal Complex - CC) 9, 15 и 121.

В период с 2012 по 2016 гг. было расследовано 7 вспышек инфекций эксфолиативного дерматита, зарегистрированных в родильных домах 6 городов России. В 4-х случаях были выделены штаммы *S. aureus* CC121, в двух случаях - CC15 и в одном случае впервые был выделен штамм *S. aureus* CC8. В 5-и случаях из 7-и у возбудителя был обнаружен ген эксфолиативного токсина А, в двух случаях были обнаружены гены эксфолиативных токсинов А и В. Стоит отметить, что одновременное присутствие двух генов эксфолиативных токсинов было выявлено только у *S. aureus*, относящихся к CC121. Также было замечено, что *S. aureus* данного клонального комплекса распространены, в основном, в Восточном регионе России, в то время как все штаммы *S. aureus* CC15 были выделены в Западном регионе. Штамм *S. aureus* CC8, способный вызывать эксфолиативный дерматит, впервые был выделен в 2013 г. от сотрудников одного из родильных домов в ходе расследования вспышки эксфолиативного дерматита среди новорождённых, возбудителем которой оказался штамм *S. aureus* CC15. В следующем году в этом же родильном доме вспышку эксфолиативного дерматита вызвал штамм *S. aureus* CC8.

Таким образом, при расследовании 7 вспышек эксфолиативного дерматита было установлено, что в Западном регионе России распространены штаммы *S. aureus*, относящиеся к CC15, в то время как в Восточном регионе выделяются штаммы *S. aureus* CC121. Впервые при вспышке эксфолиативного дерматита был выделен штамм *S. aureus* CC8, несущий ген эксфолиативного токсина А.

*Работа выполнена в рамках НИР №049 Роспотребнадзора.*

## **Генетические детерминанты антибиотикорезистентности и вирулентности уropатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Ярославле в 2016-2017 гг.**

<sup>1</sup>Служкин П.В., <sup>1</sup>Ермоленко З.М., <sup>1</sup>Асташкин Е.И., <sup>1</sup>Фурсова Н.К., <sup>2</sup>Ершова М.Г., <sup>2</sup>Полетаева Е.Д., <sup>1</sup>Шепелин А.П.

<sup>1</sup>ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», Роспотребнадзора, пос. Оболенск, info@obolensk.org;

<sup>2</sup>ГУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница № 1» Минздрава РФ, Ярославль, edin.yar@mail.ru

Цель - определение чувствительности к антибактериальным препаратам (АП) и наличия генетических структур, отвечающих за вирулентность и антибиотикорезистентность в клинических штаммах уропатогенных *Escherichia coli*.

Штаммы *E. coli* (n=20), выделенные из мочи пациентов клиник г. Ярославля в 2016-2017 гг. идентифицировали на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Чувствительность к антибактериальным препаратам 4 функциональных классов (бета-лактамам, фторхинолонам, аминогликозидам и фосфомицинам) определяли методом микроразведений в бульоне. Гены вирулентности *fimH*, *hlyA*, *cnf1*, *iroN*, *fyuA*, *iutA*, *sfaS*, *focG*, *ompT*, *papGII*, *papGIII*, *traT*, *kpsMTII*, *usp*, *cvaC*, *PAI/malX*, *afa/draBC* и генетические детерминанты антибиотикорезистентности *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, интегроны классов 1 и 2 определяли методом ПЦР, используя специфичные праймеры, секвенировали в ООО «СИНТОЛ» (Москва) и анализировали с помощью программ Vector NTI, Chromas и BLAST.

Среди 20 изучаемых штаммов *E. coli* 2 штамма были чувствительны ко всем 4 функциональным классам АП; 4 штамма - к трем функциональным классам АП; 4 штамма - к двум классам; 10 штаммов - к 1 классу АП. Выявлены гены антибиотикорезистентности: *bla*<sub>TEM</sub> (n=10), *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=6), интегроны класса 1 (n=8), несущие наборы генных кассет (n=3): *dfrA1*, *aacA4-cmlA1* и *dfrA17-aadA5*. Генов *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> и интегронов класса 2 не обнаружено. По комбинациям выявленных генов определены 6 генотипов антибиотикорезистентности. Выявлено значительное разнообразие штаммов по наборам генов вирулентности, по комбинациям генов определены 18 генотипов вирулентности. Показано, что 2 штамма, чувствительные ко всем использованным АП, характеризовались наличием 11 и 12 генов вирулентности и отсутствием гена *traT*. В отличие от них, 3 MDR штамма имели 4-6 генов вирулентности, а 1 MDR штамм – 11 генов вирулентности, при этом все они имели гены *traT*, *PAI/malX* и *kpsMTII*.

Таким образом, большинство изучаемых клинических уропатогенных штаммов *E. coli* относятся к категории антибиотикорезистентных (n=18), а 3 из них – к категории. Показано большое внутривидовое генетическое разнообразие этих штаммов: выявлено 6 генотипов антибиотикорезистентности и 18 генотипов вирулентности. Все MDR штаммы, в отличие от чувствительных к АП, имели ген *traT*.

*Исследование выполнено в рамках НИР №049 Роспотребнадзора.*

## Термофильные СО-окисляющие прокариоты

*Соколова Т.Г., Таранов Е.В., Провоторова Е.А., Черных Н.А., Лебединский А.В.*

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, [tatso2204@gmail.com](mailto:tatso2204@gmail.com)

Будучи сильным восстановителем, СО, несмотря на токсичность, служит субстратом для разнообразных микроорганизмов, как анаэробных, так и аэробных. В анаэробных условиях СО служит субстратом для роста некоторых ацетогенных, сульфатредуцирующих, метаногенных и гидрогеногенных прокариот. Среди термофилов гидрогеногенные прокариоты представлены наибольшим числом видов принадлежащих к Firmicutes, Dictyoglomi, Euryarchaeota и Streptarchaeota. Термофильные аэробные СО-окисляющие прокариоты относительно мало изучены.

Ключевыми ферментами метаболизма анаэробных СО-окисляющих прокариот являются Ni-содержащие СО-дегидрогеназы, ацетил-КоА-синтазы.

Гидрогеногенное использование микроорганизмами СО детерминируется генными кластерами, включающими гены конвертирующей энергию гидрогеназы и анаэробной СО-дегидрогеназы. Мы наблюдаем три типа таких кластеров у анаэробных прокариот, по видимому независимо образовавшихся.

Из гидротерм Камчатки мы выделили новый штамм *Thermus scotoductus* P18 способный к аэробному автотрофному росту на СО. Нами был выделен и охарактеризован аэробный гипертермофильный СО-окисляющий представитель архей *Sulfolobus* sp. штамм ETSY - это единственный представитель гипертермофилов и архей, для которого показано сопряженное с ростом аэробное окисление СО. В геноме *Sulfolobus* sp. ETSY нами выявлены детерминанты аэробного окисления СО. Из почвы вьетнамского заповедника «Кат-Тьен» нами был выделен штамм *Geobacillus thermoglucosidasius* L20 способный как к анаэробному гидрогеногенному

так и к микроаэробному окислению CO. В геноме штамма L20 содержится типичный генный кластер бактериального типа, отвечающий за анаэробное гидрогеногенное окисление CO и два кластера содержащие гены гомологичные ключевым субъединицам аэробной CO-дегидрогеназы: *coxMSL*. Филогенетически два гомолога *coxL* значительно удалены друг от друга и, одновременно, от *coxL* субъединиц подтвержденных аэробных карбоксидотрофов. Вероятно, один из этих кластеров кодирует новый тип аэробной CO-дегидрогеназы.

Полученные данные расширяют наши представления о разнообразии термофильных прокариот и механизмов обеспечивающих окисление CO.

## **Олигомерная организация рибонуклеазы *Bacillus licheniformis***

Сокуренко Ю.В., Надырова А.И., Дудкина Е.В., Ульянова В.В.

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань  
sokurenko.yulia@gmail.com

В настоящее время проблема разработки новых противоопухолевых препаратов, отличающихся таргетным действием и низкой цитотоксичностью по отношению к здоровым клеткам, поставлена наиболее остро. Перспективным является такой класс ферментов, как рибонуклеазы (РНказы). При изучении цитотоксичности РНказ млекопитающих по отношению к малигнизированным клеткам было показано, что они теряют свою активность, подвергаясь действию цитозольного ингибитора РНказ, в то время как РНказы микробного происхождения нечувствительны к его действию, что является их неоспоримым преимуществом.

Бактериальные РНказы семейства N1/T1 проявляют как противоопухолевое, так и противовирусное действие. Наиболее изученными представителями данного семейства являются биназа и барназа, синтезируемые *Bacillus pumilus* и *B. amyloliquefaciens*, соответственно. Эти два фермента схожи по первичной структуре, физико-химическим и каталитическим свойствам. Нами была найдена, охарактеризована и очищена новая низкомолекулярная РНказа *B. licheniformis* ATCC 14580, имеющая высокую степень гомологии с вышеупомянутыми РНказами и названная «балифаза».

Изучение структуры РНказ является ключевым моментом в понимании их биологического действия. Электрофоретический анализ показал, что балифаза способна формировать олигомерные структуры. С помощью средств биоинформатики были сконструированы модели димера и тримера балифазы, которые, в связи с высокой стабильностью молекулы, имеют только один тип ориентации с открытым активным центром. Наиболее вероятными, как для димера, так и для тримера, оказались модели, основанные на электростатических связях. Димеризация происходит, в основном, за счет взаимодействия как N-, так и C-концевых доменов двух молекул белка, а тример сформирован путем взаимодействия рядом аминокислот N-концевых участков. Олигомерные структуры более высокого порядка, вероятно, также являются стабильными формами существования балифазы. Образование олигомерных форм известно для многих ферментов. Более того, показано, что эта способность дает им возможность демонстрировать различные биологические эффекты. Нами получены данные, характеризующие цитотоксические эффекты новой РНказы *B. licheniformis* в отношении различных линий опухолевых клеток в сравнении с таковыми изученных ранее РНказ – биназы и барназы (РНказа *B. altitudinis*) и установлена зависимость цитотоксичности от уровня стабильности димерных структур.

## **Сохранность ДНК в разновозрастных отложениях вечной мерзлоты**

<sup>1</sup>Спирина Е.В., <sup>1,2</sup>Вишневская Т.А., <sup>1</sup>Ривкина Е.М.

<sup>1</sup>ФБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, Пущино,  
El.Spirina@gmail.com

<sup>2</sup>Университет Теннесси, Ноксвилл, Теннесси, США, tatiana.vishnivetskaya@gmail.com

Исследования в области экологии микроорганизмов вечной мерзлоты начаты в 80-х годах прошлого столетия, но вопрос о методах экстракции нуклеиновых кислот из

многолетнемерзлых отложений до сих пор остается открытым. Отложения вечной мерзлоты, различаются по гранулометрическому составу, физико-химическим свойствам, льдистости, генезису и времени замерзания, поэтому не существует универсального метода экстракции общей ДНК, который не требовал бы соответствующих модификаций.

Находясь в мерзлом состоянии, ДНК может подвергаться деградации в силу одновременного воздействия постоянных отрицательных температур и фоновой ионизирующей радиации вмещающих пород при низкой активности воды и ограниченности питательных веществ на протяжении тысяч и миллионов лет. В сравнении с подвергшейся значительному разрушению внеклеточной ДНК, геномная ДНК жизнеспособных микроорганизмов может служить источником более значимой генетической информации о структуре и составе микробного сообщества прошлых эпох. Учитывая потенциальную возможность жизнеспособных клеток к репарации ДНК, её молекулы при длительном хранении в мерзлоте, тем не менее, приобретают хрупкость и легко подвергаются механическому разрушению при экстракции, уменьшая тем самым выход и качество нуклеиновых кислот.

Данное исследование направлено на расширение знаний о степени сохранности ДНК в разновозрастных отложениях вечной мерзлоты. В работе использовали 15 образцов пресноводных озерно-аллювиальных многолетнемерзлых отложений (правый берег р. Алазея), возрастом от 3 тыс. до 3 млн. лет.

Выделение общей ДНК из образцов вечной мерзлоты проводили наборами PowerSoil® (MoBio Laboratories) и FastDNA® SPIN (MP Biomedicals). Процедура встряхивания со стеклянными гранулами увеличила выход ДНК на 16% при использовании PowerSoil® и на 37% для FastDNA\_SPIN по сравнению с методами, не включающими данную стадию. Концентрация ДНК из древних образцов вечной мерзлоты была низкой и варьировала от 0,04-0,3 мкг/г для FastDNA® SPIN до 0,2-0,5 мкг/г для PowerSoil®. Качество ДНК выделенной с помощью PowerSoil® было лучше для проведения ПЦР-амплификации и секвенирования метагенома. Следует отметить, что использование гранул может не только улучшать клеточный лизис, но и привести к разрушению хрупкой ДНК древних микроорганизмов. Показано, что очистка экстрагированной ДНК при помощи Genomic DNA Clean & Concentrator® Kit (Zymo Research) уменьшала концентрацию ДНК на 36-85%. При работе с ДНК из вечной мерзлоты необходимо оптимизировать и сократить этапы пробоподготовки, включая этапы очистки между экстракцией и секвенированием.

## Систематика актинобактерий рода *Rathayibacter* в свете геномных данных

Стародумова И.П.<sup>1,2</sup>, Тарлачков С.В.<sup>1,3</sup>, Присяжная Н.В.<sup>1</sup>, Дорофеева Л.В.<sup>1</sup>, Арискина Е.В.<sup>1</sup>,  
Василенко О.В.<sup>1</sup>, Евтушенко Л.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,

<sup>2</sup>Пушкинский государственный естественно-научный институт,

<sup>3</sup>Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, iri-starodumova@yandex.ru

Анализ геномов становится неотъемлемым элементом таксономических исследований прокариот. Число геномов бактерий и архей в международных базах данных увеличивается экспоненциально. Интеграция геномики и систематики особенно актуальна сегодня для групп микроорганизмов, включающих виды с высоким уровнем сходства на фенотипическом и филогенетическом (16S рРНК) уровнях.

Род *Rathayibacter* Zgurskaya et al. 1993 (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinobacteria*) включает 6 видов, из которых *R. rathayi*, *R. iranicus*, *R. tritici* и *R. toxicus* известны как фитопатогены. Поражают злаки, в т.ч., пшеницу; переносятся на растения галлообразующими нематодами рода *Anguina*. Включенные в работу новые штаммы изолированы из пижмы, проломника и горчака – хозяйских растений, атипичных для известных видов *Rathayibacter*. Изоляты имеют уровень сходства генов 16S рРНК с известными видами рода и между собой (до 99.7%).

Филогеномный анализ 17 штаммов (вышеупомянутые изоляты и представители описанных видов *Rathayibacter*) показал, что геномы формируют обособленный кластер в

пределах семейства *Microbacteriaceae*. Величины средней идентичности нуклеотидов (average nucleotide identity, ANI) между геномами известных видов – от 75.9 до 92.0%. В этот диапазон попадают значения ANI для штаммов ВКМ Ас-2596 и ВКМ Ас-2121 (из пижмы и проломника) – между собой (83.2%) и по отношению к типовым штаммам известных видов (76.7–84.1% и 76.8–85.3%). Штамм ВКМ Ас-2630 (из горчака) наиболее близок к типовому штамму вида *R. caricis* (ANI 94.0%). Это значение выше уровня сходства между известными видами *Rathayibacter*, но не превышает порогового значения ANI (95–96%) для штаммов, относимых к одному виду (Richter & Rossello-Mora, 2009). Результаты ДНК-ДНК гибридизации *in silico* показали, что сходство штаммов ВКМ Ас-2596, ВКМ Ас-2121 и ВКМ Ас-2630 между собой и с известными видами ниже 70% (граница разделения видов; Wayne et al., 1987).

Таким образом, на основе показателей ANI и ДНК-ДНК гибридизации *in silico* получены доказательства принадлежности к новым видам штаммов, имеющих высокий уровень сходства с известными видами по генам 16S рРНК (до 99.7%) и классическим фенотипическим признакам. Последующие исследования выявили существенные отличия изолятов из пижмы, проломника и горчака друг от друга и от типовых штаммов видов *Rathayibacter* по составу и структуре гликополимеров клеточной стенки (Стрешинская и др., 2017).

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-34-01048 мол\_а.*

## **ITS2 – инструмент для разделения видов зеленых водорослей (Chlorophyta)**

*А.Д. Темралева, С.В. Москаленко*

ФГБУН Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,  
Пушино, temraleeva.anna@gmail.com

Рост научного и коммерческого интереса к зеленым водорослям бросает вызов традиционным методам и темпам их таксономического описания. Существенно ускорить и формализовать идентификацию водорослей позволил молекулярно-генетический анализ на основе дистанционного подхода. Так, для разделения видов зеленых водорослей был выбран межвидовой порог различий в гене 18S рРНК на уровне 1-2%. Данный подход, хотя и является популярным, неоднократно подвергался критике, т.к. уровни внутри- и межвидовой дивергенции зависят от времени и скорости накопления замен в нуклеотидной последовательности и могут сильно различаться у микроорганизмов с разной эволюционной историей (Nielsen, Matz, 2006; Rubinoff et al., 2006; Janda, Abbott, 2007). Поэтому был предложен другой способ разграничения таксонов: поиск автопоморфных молекулярных признаков («молекулярных подписей») или их уникальных комбинаций, например, наличия общих мотивов небольшой протяженности или мутаций в определенных позициях. Этот способ нашел отражение в работах А. Coleman (2000, 2003, 2007, 2009), которая показала, что наличие хотя бы 1 компенсаторной замены в консервативных регионах второго внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS2) у двух водорослей коррелирует с их полной половой несовместимостью (Coleman, 2009). На основе мета-анализа большого числа данных Müller с соавт. (2007) установили, что наличие даже 1 компенсаторной замены в 93% исследованных случаев указывает на принадлежность организмов к разным видам. Этот подход был успешно применен нами при идентификации зеленых водорослей *Bracteacoccus bullatus*, *Chlorosarcinopsis eremi*, описании нового таксона *Spongiosarcinopsis* gen.nov., таксономической ревизии родов *Spongiococcum* и *Fasciculochloris*. Тем не менее, ввиду отсутствия однозначного и абсолютного критерия вида, трудностей правильного фолдинга и аннотации ITS2, идентификации компенсаторных замен следует использовать полифазный подход, учитывающий не только молекулярно-генетические данные, но и морфологические, ультраструктурные, биохимические, физиологические и экологические. Такой единой стратегии придерживаются специалисты различных направлений: альгологи, бактериологи, микологи и др. (Vandamme et al., 1996; Komárek, 2006; Pröschold, Leliaert, 2007; Vaquião et al., 2013; Ramasamy et al., 2014).

*Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60020 мол\_а\_дк.*



## Стимулирующий эффект никлозамида на биосинтез феназинов у бактерий рода *Pseudomonas*

Н.А. Тетенева, М.В. Журина, С.В. Мартьянов, В.К. Плакунов

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского,  
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
Москва, plakunov@inmi.ru

Феназины – гетероциклические соединения, образуемые многими прокариотами - обладают широким спектром антибиотической активности и являются факторами вирулентности. К примеру, пиоцианин, выделяемый *Pseudomonas aeruginosa*, вызывает окислительный стресс в тканях хозяина, повреждая его клетки и выполняя тем самым важную роль в патогенезе. Для некоторых феназинов также показана противоопухолевая активность (Guttenberger et al., 2017).

Традиционный антигельминтный препарат никлозамид, у которого нами обнаружена антибиопленочная активность (Журина и соавт. 2017), значительно стимулирует синтез феназинов планктонными культурами и биопленками *P. chlororaphis* и *P. aeruginosa*. Наиболее выражен стимулирующий эффект в планктонной культуре штамма дикого типа *P. aeruginosa*, у которого возрастает не только общий синтез феназинов, но и продуктивность штамма в пересчете на количество жизнеспособных клеток.

Поскольку стимулирующий эффект никлозамида сильнее проявляется в биопленках мутантов *P. aeruginosa* и *P. chlororaphis* с дефектом в системе quorum sensing, изучение механизма действия никлозамида позволяет лучше понять регуляторную роль этой системы в биосинтезе феназинов.

Исследование пигментного состава штаммов *P. aeruginosa* показало, что никлозамид стимулирует синтез пиоцианина и 1-феназин-карбоновой кислоты (РСА). РСА является биосинтетическим предшественником пиоцианина (Blankenfeldt, Parsons, 2014) и одним из первых продуктов биосинтеза феназинов. Поэтому весьма вероятно, что мишенью никлозамида является один из ферментов шикиматного пути.

Феназины обладают антибактериальным и противогрибковым действием, что делает их перспективной основой для создания нового поколения антибиотиков. В связи с ростом устойчивости патогенных бактерий к уже имеющимся антибиотикам поиск новых антибактериальных веществ становится особенно актуальным. Полученные результаты показывают, что никлозамид представляет собой ценный в практическом отношении стимулятор биосинтеза феназинов.

## Холестеринметаболизирующая активность *Staphylococcus aureus*

Трапезников Я.П., Быкова Л.П., Годовалов А.П.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера»  
Пермь, yakov.trapeznikow@mail.ru

Стафилококки являются значимыми участниками микробиоценоза человека. Для успешной колонизации полостей и тканей организма они используют биологически активные вещества и могут участвовать в метаболизме хозяина. Наряду с токсическим действием стафилококки могут проявлять и непатогенные феномены с потенциальной пользой для хозяина. Интерес представляет участие стафилококков в процессах липидного обмена.

Цель исследования – изучить холестеринметаболизирующую активность *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы. Исследования проведены на 39 клинических штаммах *S. aureus*. Для культивирования микроорганизмов использовали мясо-пептонный бульон с добавлением сыворотки крови в качестве источника холестерина. Концентрацию холестерина определяли в пробах перед культивированием и после него с помощью набора реагентов ЗАО "Вектор-Бест" согласно инструкции. Детекцию результатов осуществляли на планшетном спектрофотометре ChroMate (Awareness Technology Inc., USA). Принцип метода основан на образовании

окрашенного соединения под воздействием холестериноксидазы. Интенсивность окраски в реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе, которую определяют расчетным методом. Статистическую обработку данных проводили с использованием парного варианта *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В ходе проведенных исследований установлено, что 89,7% штаммов способны снижать концентрацию холестерина в инкубационной среде с  $3,23 \pm 0,06$  до  $2,68 \pm 0,04$  ммоль/л ( $p < 0,05$ ). В 10,3% случаев концентрация холестерина в ходе культивирования *S. aureus* статистически значимо не изменилась. В контрольных пробах, не содержащих *S. aureus*, изменения концентрации холестерина не зарегистрировано, что позволяет исключить саморазрушение холестерина за период культивирования.

Известно, что *S. aureus* включает в свой метаболизм общий предшественник холестерина – пресквален дифосфат, из которого кроме этого образуется эргостерол. Можно предположить, что при инфицировании пресквален дифосфат используется *S. aureus* для синтеза стафилоксантина, который необходим для синтеза бактериальной клеточной стенки и обуславливает золотистое окрашивание штаммов при их культивировании на агаризованных средах.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что *S. aureus* обладает холестеринметаболизирующей активностью.

## Сравнительная геномика бактерий *Sphaerochaeta*

Трошина О.Ю., Ошуркова В., Щербакова В.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино, [oltro676@yandex.ru](mailto:oltro676@yandex.ru)

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*, которая была выделена нами из бинарной метаногенной культуры со штаммом *Methanosarcina* sp. 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 показал отсутствие у всех исследованных бактерий *Sphaerochaeta* spp. 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. *S. associata* и *S. globosa* содержат гены гомологичные хондроитин дисахарид гидролазам и хондротин лиазам. В геномах отсутствуют гены, кодирующие компоненты дыхательных электрон-транспортных цепей. Все *Sphaerochaeta* являются аэротолерантными анаэробами и содержат гены белков детоксикации кислородных радикалов. Бактерии *S. associata*, *S. globosa* и *S. pleomorpha* содержат только четыре гена в пути биосинтеза кобаламина. 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.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-04-08612.

## Сравнительный анализ геномов группы «*Bacillus subtilis*», разделенных по способности секретировать гуанилпредпочитающие рибонуклеазы

Ульянова В.В., Шах Махмуд Р., Дудкина Е.В., Вершинина В.И., Ильинская О.Н.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, uyanova.vera@gmail.com

Гуанилпредпочитающие рибонуклеазы бацилл представляют семейство РНКаз N1/T1/U2, включающее небольшие белки, которые расщепляют РНК преимущественно после гуаниловых остатков с образованием 3'-нуклеозид монофосфатов через 2',3'-циклофосфат производные. Биосинтез многих гуанилпредпочитающих РНКаз бацилл индуцируется в условиях фосфатного голодания и взаимосвязан с азотным и углеродным обменом. Главной их функцией считается «пищеварительная». Только некоторые члены группы «*B. subtilis*» внутри рода *Bacillus* синтезируют такие ферменты. Вместе с тем, бациллы при недостатке фосфора также секретируют высокомолекулярную неспецифичную РНКазу, гидролизующую РНК с образованием 5'-нуклеозид монофосфатов и обладающую значительно более низкой ферментативной активностью. У бацилл обнаружено два внутриклеточных ингибитора РНКаз - барстар и YrdF. Однако об их специфичности ничего не известно. В настоящей работе было проведено сравнение геномов бацилл, продуцирующих гуанилпредпочитающие РНКазы, с остальными представителями группы «*B. subtilis*». Из геномов типовых штаммов РНКазообразующих (*B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. altitudinis* 41KF2b, *B. atrophaeus* NRS 1221A, *B. invictae* DSM 26896, *B. pumilus* MTCC B6033, *B. licheniformis* ATCC 14580, *B. safensis* FO 36b, *B. xiamensis* НУС 10, *B. methylotrophicus* JS25R) и РНКазо-необразующих бацилл (*B. subtilis* subsp. *subtilis* 168, *B. sonorensis* L12, *B. tequilensis* КСТС 13622, *B. vallismortis* DV1 F3, *B. mojavensis* КСТС 3706) было создано два мета-контига в виде кор-геномов с помощью сервера «Edgar 2.2», при их сравнении выявлено, что 1726 генов являются общими, 409 - есть только у РНКазообразующих и 389 - у РНКазо-необразующих штаммов. Функциональный анализ групп с помощью «String» показал, что штаммы без РНКазы синтезируют пептиды-сидерофоры, в то время как РНКазо-продуцирующая группа имеет уникальные особенности РНК метаболизма, обе группы различаются по азотному обмену. Генетический контекст генов РНКаз в целом консервативен, но близкое окружение разнится. Обе внеклеточные РНКазы экспрессируются на одинаковом уровне в стационарную фазу роста бактерий. Ортологи барстара обнаружены только у трех видов, в то время как ортологи YrdF - у всех видов, кроме трех. Синтез ингибиторов происходит на постоянном уровне. Выявленные уникальные особенности РНКазообразующих видов бацилл позволяют глубже понять функциональное назначение этих ферментов.

## Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их свойства

Урядова Г.Т., Фокина Н.А., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В.

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»  
Саратов, eni\_galina@mail.ru

Экзополисахариды (ЭПС) молочнокислых бактерий получили широкое применение во многих отраслях деятельности человека. Потребность в этих биополимерах постоянно возрастает, поэтому поиск и изучение новых продуцентов ЭПС являются важным направлением микробиологии и биотехнологии.

Из молочнокислых бактерий – *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* В-1662 были выделены ЭПС. Оптимальными условиями продуцирования ЭПС явилось культивирование бактерий при 180 об/мин на среде А. Welman [5] с сахарозой, рН 5.5, температура 38°C, в течение 24 часов для *S.thermophilus* и 27°C в течение 48 часов для *L.lactis* В-1662. Молекулярная масса ЭПС стрептококка составляла 20 кДа, лактококка – 10 кДа, относительная вязкость – 1,2 мм<sup>2</sup>/с и 1,3 мм<sup>2</sup>/с соответственно. Моносахаридный состав ЭПС *S.thermophilus* представлен глюкозой и рамнозой, а ЭПС *L.lactis* В-1662 – глюкозой и ксилозой.

ЭПС данных культур проявляли в разной степени бактерицидное действие в отношении: *Escherichia coli* 113-13 и ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Pseudomonas aeruginosa* AT-31 и ATCC 27853, *Xanthomonas campestris* 610 и 611. Кроме того, ЭПС *S.thermophilus* угнетал рост *Klebsiella pneumoniae* K2, а ЭПС *L.lactis* B-1662 – *B.subtilis* 262. Фунгицидная активность ЭПС *S.thermophilus* и *L.lactis* B-1662 в отношении *Candida albicans* 223 и 13108 не была обнаружена.

Обнаружена способность ЭПС *S.thermophilus* и *L.lactis* B-1662 индуцировать синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\alpha$  и ФНО- $\alpha$ ) иммунокомпетентными клетками при моделировании процесса фагоцитоза *S.aureus* 209-P in vitro. Аналогичные данные ранее были получены и в отношении ЭПС других молочнокислых бактерий – *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* [6].

## **Филогенетическое родство генов, ответственных за синтез липополисахарида и капсулы, в штаммах *Klebsiella pneumoniae* разных сиквенс-типов**

Фурсова Н.К., Лев А.И., Шайхутдинова Р.З., Воложанцев Н.В.

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,  
Оболенск, info@obolensk.org

*Klebsiella pneumoniae* – возбудитель госпитальных инфекций (мочевыделительной, дыхательной системы, кровотока и др.), а также тяжелых негоспитальных инфекций (первичных гнойных абсцессов печени, эндофтальмитов, менингитов и др.), характеризующихся метастазированием патогена из очага инфекции в другие органы и ткани. Это связано с наличием двух филогенетически дискретных линий *K. pneumoniae* – классических (сКр), отличающихся высоким уровнем устойчивости к антимикробным препаратам (АП), и гипервирулентных (hvКр), которые редко являются резистентными к АП, но несут гены, кодирующие факторы вирулентности клебсиелл. Одним из важных признаков hvКр является гипермукоидность, ассоциированная с наличием гена *rmpA*. Кроме того, большой вклад в вирулентные свойства клебсиелл вносит липополисахарид (ЛПС), свойства которого связаны с продуктами генов *wabG* и *uge*, кодирующими гликозилтрансферазу и галактуронат-4-эпимеразу.

Клинические штаммы *K. pneumoniae* (n=31), выделенные в 2012-2016 гг. от пациентов нейрохирургического ОРИТ г. Москвы охарактеризованы с точки зрения корреляции между их сиквенс-типами (ST) и нуклеотидными последовательностями генов *rmpA*, *wabG* и *uge*. Видовую принадлежность штаммов определяли на приборах MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия) и Vitek-2 Compact (BioMérieux, Франция). Гипермукоидность штаммов определяли методом стринг-теста. Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) осуществляли в соответствии с протоколом базы данных MLST Pasteur (Франция). Гены вирулентности *K. pneumoniae* амплифицировали и секвенировали в ООО SINTOL (Moscow). Дендрограммы, отражающие генетическое родство штаммов *K. pneumoniae* разных сиквенс-типов, последовательностей ДНК генов *rmpA*, *wabG* и *uge*, построены с помощью программы MegaB.

Определена принадлежность изучаемых штаммов *K. pneumoniae* к 11 сиквенс-типам: ST218 (n=8), ST23 (n=7), ST147 (n=3), ST395 (n=3), ST48 (n=2), ST86 (n=2), ST65 (n=1), ST833 (n=1), ST1544 (n=1), ST2174 (n=1), ST2280 (n=1) и к неидентифицированному (n=1). Показано наличие корреляции распределения штаммов в филогенетических деревьях, построенных на основе анализа последовательностей ДНК генов *rmpA*, *wabG*, и *uge*, а также анализе последовательностей генов «домашнего хозяйства», включенных в схему MLST-типирования *K. pneumoniae*.

Работа выполнена в рамках Гранта РФФ 15-15-00058.

# Интенсификация продукции секретируемых рибонуклеаз рода *Bacillus* в стрессовых условиях

Харитоновна М.А., Бейсенова Ж.А., Колпаков А.И., Ульянова В.В.

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", Казань  
Maya\_Kharitonova@mail.ru

Способность быстро адаптироваться к условиям среды обитания является важной характеристикой представителей рода *Bacillus*. Уровень экспрессии ключевых генов в стрессовых условиях находится под контролем сети систем трансдукции сигнала. При периодическом культивировании в стадию замедления роста и на протяжении стационарной фазы активно секретируются ферменты деградаци, необходимые для ассимиляции труднодоступных питательных компонентов. В окружающей среде стрессовое голодание происходит многократно. В данных условиях секретируемые рибонуклеазы обеспечивают клетку макроэлементами и органогенами, входящими в состав РНК. РНКазы формируют две группы гомологичных ферментов: 3'-фосфат-образующие гуанил-предпочитающие низкомолекулярные циклизующие РНКазы и высокомолекулярные РНКазы, неспецифически гидролизующие РНК до олигонуклеозид-5'-фосфатов.

Биосинтез охарактеризованных секретируемых РНКаз бацилл обеих групп (кроме РНКазы *B. amyloliquefaciens*) происходит в условиях дефицита неорганического фосфата. Экспрессия генов фосфат-регулируемых гуанилспецифичных РНКаз осуществляется посредством белков двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции PhoP-PhoR. Промоторы генов всех высокомолекулярных РНКаз наряду с промотором низкомолекулярной РНКазы *B. circulans* не содержат последовательностей, узнаваемых регуляторным белком PhoP, и не являются членами Pho регулона. В условиях азотного голодания возрастает уровень биосинтеза низкомолекулярных РНКаз *B. pumilus* и *B. circulans*. С использованием штаммов, лишенных генов NrgA (транспортер аммония) и TnrA (белок-регулятор), установлена TnrA-регуляция экспрессии генов исследуемых РНКаз. Помимо стрессов, лимитирующих доступность питательных веществ, солевой стресс активизирует продукцию секретируемых низкомолекулярных и высокомолекулярных РНКаз (РНКаз *B. pumilus* и *B. subtilis*). С помощью штаммов, несущих мутации в гене белка-регулятора DegU, показано, что система трансдукции сигнала DegS-DegU принимает участие в регуляции экспрессии генов РНКаз в условиях солевого стресса.

Полученные экспериментальные результаты, а также данные анализа структур промоторов свидетельствуют о том, что в условиях стрессов, ограничивающих доступность питательных веществ, и при солевом стрессе, интенсифицируется продукция секретируемых рибонуклеаз рода *Bacillus*.

## Разнообразие генов ключевых ферментов автотрофного метаболизма в осадках горячего источника Солнечный, кальдера Узон, Камчатка

<sup>1</sup>Черных Н.А., Кубланов И.В., Лебединский А.В

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр  
Фундаментальных основ биотехнологии РАН, Москва

<sup>1</sup>Автор для корреспонденции chernyh3@yandex.ru

Прокариоты отличаются большим разнообразием механизмов автотрофной ассимиляции неорганического углерода: в настоящее время известно шесть таких путей (цикл Кальвина–Бенсона, восстановительный цикл трикарбоновых кислот, путь Вуда–Льюнгаля, гидроксипропионатный цикл, гидроксипропионат-гидроксипропионатный цикл и дикарбоксилат-гидроксипропионатный цикл). Все эти пути встречаются и у термофильных прокариот, однако наиболее распространенными среди последних являются восстановительный цикл трикарбоновых кислот (вЦТК), свойственный бактериям филума *Aquificae*, и путь Вуда–Льюнгаля, характерный для большинства автотрофных *Firmicutes*. Гипертермофильные археи

семейства *Thermoproteaceae* ассимилируют неорганический углерод с помощью дикарбоксилат-гидроксibuтиратного цикла.

Ранее, проведенный нами анализ метагенома, полученного из ДНК источника Солнечный, показал, что доля геномов, имеющих в своем составе ген ключевого фермента цикла Кальвина–Бенсона РуБисКО, составила 31%. При этом, в источнике встречались все формы РуБисКО, за исключением формы II. Доля формы I РуБисКО, фермента с доказанным участием в автотрофной ассимиляции, составила всего 1%.

В этой работе будут представлены данные о присутствии генов ключевых ферментов восстановительного цикла трикарбоновых кислот, пути Вуда-Люнгаля, гидроксипропионатного, гидроксипропионат-гидроксibuтиратного и дикарбоксилат-гидроксibuтиратного циклов.

## **Протеализиновый оперон *Serratia proteamaculans* кодирует новый ингибитор пептидаз семейства M4**

Чухонцева К.Н., Лемескина И.С., Сафина Д.Р., Демидюк И.В.

ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН; Москва, ksysha57@bk.ru

Пептидазы семейства M4 – протеолитические ферменты, которые широко распространены у бактерий, а также встречаются у архей и грибов. Семейство включает две группы. Представители первой близки к прототипу семейства термолизину и, по-видимому, выполняют преимущественно трофические функции. Вторая группа объединяет протеализинподобные протеазы (ППП). Многие микроорганизмы, продуцирующие ППП, являются симбионтами или патогенами растений и животных, а также способны вызывать заболевания человека. Несмотря на то, что биологическая роль ППП изучена мало, имеющиеся данные указывают на вовлеченность этих ферментов во взаимодействиях бактерий с высшими организмами. Так, протеализин *Serratia proteamaculans* и гримелизин *Serratia grimesii* участвуют в бактериальной инвазии клеток человека. Протеаза PrtS, продуцируемая симбионтом энтомопатогенных нематод бактерией *Photorabdus luminescens*, подавляет антибактериальную защиту насекомых, вызывая неконтролируемую меланизацию. Фермент Prt1 из *Pectobacterium carotovorum*, по-видимому, играет важную роль в развитии мягкой гнили растений, расщепляя белок клеточной стенки растений экстензин.

Проведенный нами анализ геномов микроорганизмов, продуцирующих ППП, позволил обнаружить, что за геном ППП всегда следует ген небольшого консервативного гипотетического белка – белка, ассоциированного с протеализином (Pass). Детальный анализ областей геномов, в которых локализованы гены ППП и белков, подобных Pass, показал, что эти гены организованы в оперон.

Для выяснения функциональной роли белков Pass нами получен продуцент белка из *S. proteamaculans* на основе *E. coli*. Изучение рекомбинантного белка позволило впервые установить, что Pass является эффективным ингибитором протеализина, а также способен ингибировать термолизин. Кроме того, с использованием метода иммуноблоттинга было выявлено, что в *S. proteamaculans* Pass имеет внутриклеточную локализацию. Таким образом, нами впервые обнаружено, что гены ППП у бактерий входят в состав оперонов, включающих также гены ранее неизвестных ингибиторов протеаз семейства M4.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-01048.

## **Роль ДНК-связывающего PadR-подобного белка в образовании и поддержании покоящегося состояния микобактерий**

Шлеева М.О., Трутнева К.А., Шумков М.С., Демина Г.Р., Капрельяну А.С.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, Москва, inbi@inbi.ras.ru

Образование покоящихся форм *Mycobacterium tuberculosis* лежит в основе явления латентности туберкулеза. Молекулярные механизмы перехода активных микобактерий в

состояние покоя до сих пор не выяснены. Ранее нами было показано, что в результате закисления внешней среды образуются покоящиеся клетки *M. tuberculosis* и *Mycobacterium smegmatis*.

Анализ мембран покоящихся клеток *M. smegmatis*, выявил значительное накопление белка MSMEG\_6227, имеющего сайт связывания с ДНК, и входящего в состав крупных комплексов (более 680 кДа). В экстракте мембран активных бактерий найдена только мономерная форма белка среди минорных сигналов. Использование бромида этидия позволило выявить наличие нуклеиновых кислот (НК) в месте локализации белка MSMEG\_6227 на акриламидном геле экстрактов мембран покоящихся бактерий. После обработки ДНКазой в этой зоне исчезали как НК, так и белок. Микобактерии штамма *M. smegmatis* с гиперэкспрессией белка MSMEG\_6227 (*ovMSMEG-6227*) отличались более медленной скоростью роста на плотных и жидких средах по сравнению с клетками контрольного штамма. Метаболическая активность, а именно синтез РНК, *ovMSMEG-6227* была в 2 раза ниже, чем в клетках контрольного штамма. При сравнении протеомных профилей этих штаммов было обнаружено, что в штамме *ovMSMEG-6227* происходит исчезновение ряда белков, при этом новых появляется очень мало. Обращает на себя внимание отсутствие следующих АВС транспортеров: MSMEG\_0550 (сульфонат-связывающий белок), MSMEG\_0795 (АВС-2), MSMEG\_1374 (транспортер рибозы). Также исчезают F420-зависимые метилентетрагидрометанооптерин редуктазы: MSMEG\_1996 и MSMEG\_2456, участвующие в восстановительных реакциях и глицераткиназа MSMEG\_2528, участвующая в фосфорилировании органических кислот.

Среди белков, которые появляются *de novo* выделяются глутамин-тРНК-синтетаза (MSMEG\_2383), глицил-тРНК-синтетаза (MSMEG\_4485) и антранилат фосфорибозилтрансфераза (MSMEG\_4258), хорошо представленные в протеоме покоящихся клеток *M. smegmatis*.

Мы предполагаем, что исследуемый белок выполняет несколько функций: в качестве структурного элемента стабилизирует и сохраняет нуклеиновые кислоты от разрушения и/или принимает участие в процессах «торможения» метаболизма клеток при переходе в состояние покоя, являясь транскрипционным регулятором (возможно негативным).

*Работа поддержана грантом РФФ № 16-15-00245.*

## **Разработка системы контроля антибиотикорезистентности в условиях сельскохозяйственного производства**

*Щепеткина С.В.<sup>1</sup>, Терлецкий В.П.<sup>1</sup>, Новикова О.Б.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУ Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Генетики и Разведения Животных, <sup>2</sup>Всероссийский Научно-Исследовательский Ветеринарный Институт Птицеводства – филиал ФНЦ ВНИТИП РАН

На протяжении многих лет для профилактики желудочно-кишечных заболеваний животных и птицы широко использовали кормовые антибиотики и антимикробные препараты (АМП) без определения чувствительности. Это привело к появлению антибиотикорезистентных штаммов бактерий, вызывающих тяжелые заболевания, плохо поддающиеся лечению, передачу антибиотикорезистентных штаммов людям. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов наиболее актуальна для отрасли птицеводства. Большинство птицефабрик за цикл выращивания цыпленка-бройлера проводит от двух до четырех курсов антибиотикотерапии. Чувствительность микроорганизмов к АМП снижается уже после первого курса применения. Ущерб производству складывается из снижения сохранности и категорийности выпускаемой продукции, увеличение падежа и конверсии корма, расходов на препараты и работу специалистов. За период с 2013 по 2016г. чувствительность возбудителей болезней птиц бактериальной этиологии снизилась к фторхинолонам – на 27,0%, к аминогликозидам – от 11,2 до 67,3%, к тетрациклам – от 52,1 до 67,3 %. Достоверно доказана корреляция между количеством применяемого АМП и удельным весом резистентных к нему штаммов, выделенных от продуктивных животных. Резистентные штаммы, контаминирующие пищевые продукты, являются резервуаром генов резистентности и могут передавать их микроорганизмам нормальной микрофлоры или другим патогенным

микроорганизмам во время их пребывания в кишечнике человека. Чувствительность к АМП, принадлежащих к одному фармакологическому классу, микроорганизмов одного вида, значительно варьирует в пределах региона в зависимости от многих факторов. Для прогнозирования тенденции появления и распространения устойчивых штаммов необходим систематический мониторинг за антимикробной резистентностью. Одним из путей решения данной проблемы является разработка системы контроля бактериальных болезней животных и птиц в условиях сельскохозяйственного производства. Система разрабатывается с учетом особенностей конкретного региона, но вне зависимости от места локализации ключевыми принципами являются: исключение бесконтрольного применения АМП в животноводстве и снижение уровня их потребления; мониторинг резистентности с учетом особенностей технологии ведения производства; проведение интегрированного надзора за резистентностью штаммов, выделенных от людей, сельскохозяйственных животных и продуктов питания с целью оптимизации схем применения антимикробных препаратов. Предлагаемые к практическому внедрению новые методы генотипирования бактериальных патогенов и выявления генов антибиотикорезистентности, подбора терапевтически и экономически эффективных антимикробных препаратов для лечения животных и птицы будут достаточно легко воспроизводимы в современных ветеринарных лабораториях, эффективным инструментом для мониторинга распространения и профилактики болезней бактериальной этиологии.

### **Белковые элиситоры болезнеустойчивости и антимикробные пептиды непатогенных для растений штаммов мицелиальных грибов: идентификация, механизм действия, роль в биоконтроле фиопатогенов**

*Щербакова Л.А.<sup>1</sup>, Одинцова Т.И.<sup>2</sup>, Стахеев А.А.<sup>3</sup>, Семина Ю.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Большие Вяземы

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, Москва

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина-Ю.А.Овчинникова, Москва, larisa@vniif.ru

Взаимодействие патогенных, эндофитных и сапротрофных мицелиальных грибов с растениями и микроорганизмами осуществляется путем молекулярного диалога, в котором важную роль играют различные метаболиты этих грибов, в том числе белковые элиситоры, индуцирующие защитные ответы растений, и антимикробные белки или пептиды, которые могут давать их продуцентам преимущества в конкурентной борьбе с другими микроорганизмами. Некоторые почвообитающие микромицеты, потенциальные агенты биоконтроля фиопатогенов, служат богатым источником подобных метаболитов.

Стратегия поиска, идентификации и определения механизмов действия указанных метаболитов продемонстрирована нами на примере исследований непатогенных для растений штаммов фузариевых грибов. В частности показано, что штамм FS-94 (*Fusarium sambucinum*) защищает томат от фузариозного увядания и яровую пшеницу от корневых гнилей грибной этиологии, синтезируя белки, вызывающие активацию и прайминг салицилат-зависимой сигнальной системы этих растений. С помощью метода глубокого секвенирования транскриптома пшеницы *Triticum kiharae* установлено, что под воздействием элиситоров FS-94 в растении происходит усиление экспрессии генов, кодирующих ряд антимикробных пептидов. Кроме того, в культуральной жидкости данного штамма обнаружены антифунгальные белки, ингибирующие прорастание спор возбудителей септориоза пшеницы и альтернариоза моркови.

У биоконтролирующего штамма CS-20 (*F. oxysporum*) идентифицирован новый цистеин-содержащий белок CS20EP - элиситор системной устойчивости к вилту томата. В геноме гриба выявлена нуклеотидная последовательность, кодирующая CS20EP, и определена его полная аминокислотная последовательность. Экспериментально установлено, что CS20EP индуцирует в растении изменение ионного обмена на плазмалемме, связанное с генерацией АФК, усиленную экспрессию ассоциированного с системной приобретенной устойчивостью медиатора PR-1, а также аккумуляцию и повышение активности некоторых защитных ферментов.



Обсуждаются филогенетические связи белковых элиситоров мицелиальных грибов и их роль в биоконтролирующем эффекте штаммов-продуцентов.

## **Характеристика параметров стресс-ответа микроорганизмов на действие 2,4,6,-тринитротолуола**

*Яковлева Г.Ю., Горбунова А.С., Ильинская О.Н.*

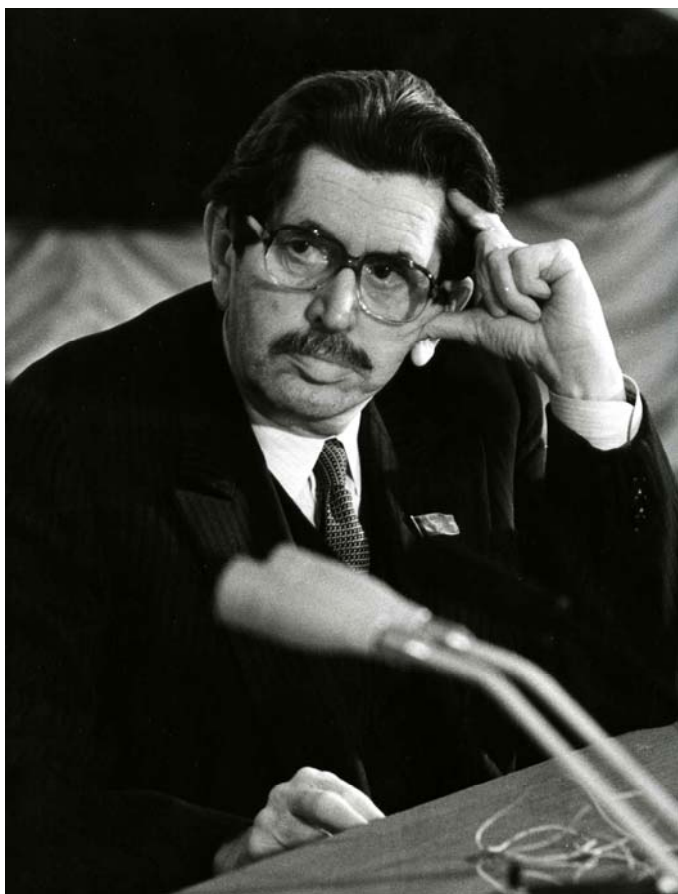
<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, yakovleva\_galina@mail.ru

2,4,6,-тринитротолуол (ТНТ) попадает в биосферу вследствие взрывных работ и военных действий. Нитротолуолы токсичны, всасываются через кожу, окисляют гемоглобин крови в метгемоглобин, вызывают анемию, отрицательно влияют на центральную нервную систему, функцию почек и печени. Микробное разрушение ТНТ достаточно хорошо изучено, поскольку именно микроорганизмы являются основными деструкторами этого соединения и участвуют наряду с небиологическими электрохимическими и фотохимическими реакциями в процессах элиминации этого токсичного загрязнителя. Целью настоящего исследования стал анализ параметров и полная характеристика неспецифического и специфического стресс-ответа бактерий на действие ТНТ, включая морфо-физиологические изменения и изменения протеома микроорганизмов, способных трансформировать этот нитроароматический поллютант.

Нами получены данные о неспецифической стресс-реакции на ТНТ: индукции этим соединением некультивируемого состояния бактерий, способных к его деструкции. В первую фазу стресс-ответа клеток, растущих в присутствии ТНТ, зафиксировано изменение метаболической и дыхательной активности, состояния мембран, выявлен дисбаланс кофакторов оксидоредуктаз – показатели, характеризующие симптомы повреждения. Показано, что ТНТ индуцирует метаболический стресс, связанный с токсическими и генотоксическими свойствами его метаболитов, и окислительный стресс, сопровождающийся повреждением макромолекул и клеточных структур. Индукция защитных реакций второй фазы стресс-ответа, направленных на нейтрализацию возникающих повреждений, связана с активацией антиоксидантных ферментов у микроорганизмов, выращенных в присутствии ТНТ, и возможностью переключения стратегий трансформации при изменении условий культивирования грамположительных (*Bacillus pumilus*), грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий, видовая принадлежность которых подтверждена методом MALDI-TOF спектрометрии и . При переходе к третьей фазе стресс-ответа, стандартно характеризующейся гибелью клеток, обнаружены рефрактерные формы бактерий с уменьшенными размерами и уплотненной клеточной стенкой. Впервые проведен сравнительный протеомный анализ белков *Bacillus pumilus*, выращенных в присутствии и отсутствии ТНТ. Показано, что стресс-ответ, индуцируемый ТНТ, вызывает прежде всего активацию биосинтеза ферментов окислительного стресса. С учетом генерации супероксид-аниона при действии ТНТ на бактерии, получены данные об усилении экспрессии генов окислительного стресса *soxRS* и *sodA*. Кроме активации супероксиддисмутазы, получены результаты, характеризующие активность каталазы и глутатионпероксидазы. Мутация *gshA*, приводящая к дефициту по глутатиону, усиливает чувствительность бактерий к токсическому действию ТНТ. Внесение глутатиона в среду культивирования бактерии приводит к снижению количества активных форм кислорода и активации процесса трансформации ТНТ.

## Секция: Микробные технологии

### Микробные технологии (посвящается 100-летию со дня рождения академика Г.К. Скрыбина)



Конгресс проходит в канун замечательной даты – 100-летия со дня рождения академика АН СССР Георгия Константиновича Скрыбина, выдающегося советского микробиолога, одного из основоположников промышленной биотехнологии и прикладной микробиологии в нашей стране.

Начиная с 1960-х годов Г.К. Скрыбин являлся одним из крупнейших советских учёных в области технической микробиологии, по сути возглавляя эту научную отрасль в СССР. Под его руководством и личном участии проведены исследования по изысканию в природе активных микроорганизмов, способных осуществлять трансформацию органических соединений. Разрабатывались научные основы использования этих микроорганизмов с целью получения биологически активных веществ, имеющих важное значение для медицины и народного хозяйства. В составе группы авторов разработки научных основ микробиологического

получения белков из углеводов нефти, Г.К. Скрыбин был удостоен Государственной премии СССР (1971 г.).

Изучалась роль микроорганизмов в процессах вовлечения ксенобиотиков в цикл углерода, процессы твердофазного роста грибов на лигноцеллюлозных отходах сельского и лесного хозяйства; разработаны сбалансированные белковые корма для пчеловодства. Предложен ряд лекарственных и ветеринарных препаратов нового типа на основе комплекса литических ферментов.

Целый ряд работ имели принципиальное значение для развития микробной биоконверсии стероидов — уже в конце 60-х годов в СССР начаты исследования в области физиологии иммобилизованных микроорганизмов, создание биокатализаторов пролонгированного действия на их основе, разработка технологий получения кортикостероидов и их дегидроаналогов. В начале 80-х годов были разработаны и успешно прошли заводские испытания технологии получения преднизолона на основе иммобилизованных бактериальных клеток.

Георгий Константинович являлся вице-президентом Генерального комитета Международного Совета научных обществ (YCSU), членом Консультативного совета Международной ассоциации микробиологических обществ, Президентом Всесоюзного микробиологического общества.

## Полифункциональные ферментные биопрепараты, действующие против бактериоза растений

Асланлы А.Г., Сенько О.В., Маслова О.В., Ефременко Е.Н.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, elena\_efremenko@list.ru

В настоящее время в Российской Федерации отмечают усиление вредоносности известных и появление новых возбудителей бактериозов растений. Для предотвращения распространения инфекционных заболеваний в растениеводстве используются различные антибиотики, что дает значительный экономический эффект. Однако их применение в сельском хозяйстве должно проводиться с осторожностью. Опыт последних лет свидетельствует о том, что широкое распространение антибиотиков способствует возникновению устойчивых к ним форм патогенных микроорганизмов.

Среди наиболее распространенных возбудителей бактериоза растений известны грамотрицательные бактерии родов *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Pantoea* и др., которые способны реализовывать кворумный ответ, обеспечивающий координированное устойчивое коллективное поведение популяции этих микроорганизмов. Для подавления клеток бактерий, находящихся в состоянии популяций высокой плотности (кворума), требуются повышенные концентрации антибактериальных препаратов.

Развитие кворумного ответа у грамотрицательных клеток сопряжено с накоплением N-ацил-гомосеринлактонов, выполняющих роль автоиндукторов развития ответа у большинства из них.

Снизить эффективную дозу антибиотиков, используемых против данных патогенов, возможно при использовании биопрепаратов, полученных на основе антибиотиков и стабилизированных форм ферментов, способных гидролизовать ацилгомосеринлактоны. В данной работе, в качестве такого фермента использовалась гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза His<sub>6</sub>-ОРН. Ранее было установлено, что она, помимо способности гидролизовать фосфорорганические пестициды, также обладает лактоназной активностью.

Для стабилизации активности фермента предложено его использование в составе новых биопрепаратов в виде полиэлектролитных комплексов с добавлением полиаспарагиновой и полиглутаминовой кислот.

В данной работе тестирование разрабатываемых ферментных биопрепаратов проводилось на томатах, пораженных бактериями *Xanthomonas campestris* (черная бактериальная пятнистость). Установлено, что стабилизированные ферментные биопрепараты в комбинации с антибиотиками снижают требуемую дозу введения антимикробных препаратов до 10 раз в зависимости от стадии роста бактериальных клеток.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №16-14-00061).*

## Энергосберегающая технология получения биоэтанола из ультрадисперсного растительного сырья

Атыкян Н.А., Ревин В.В.

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Саранск, kistig2@yandex.ru

В настоящее время наблюдается прогрессирующий дефицит ископаемых источников энергии и материалов. В последние годы резко повысился интерес к биоэтанолю и другим видам топлива из возобновляемого растительного сырья из-за дальнейшего роста цен на нефть, а также в связи с Киотским соглашением 1997 г., направленным на снижение выброса в атмосферу газов, вызывающих парниковый эффект. Производство биоэтанола топливного назначения – одна из динамично развивающихся отраслей во всем мире. При этом разрабатываются и реализуются меры по снижению его себестоимости и нагрузки на окружающую среду. Одной из таких мер является внедрение энергосберегающей технологии низкотемпературной предобработки растительного сырья предварительно измельченного до ультрадисперсных частиц.

В качестве сырья исследовалось зерновое (пшеница, ячмень, рожь) и целлюлозосодержащее (опилки березовые и сосновые, солома) сырье. Сырье предварительно измельчалось (сухой помол) до размеров частиц менее 300 мкм. Полученные ультрадисперсные частицы подвергались ферментативному гидролизу в мягких условиях (при температурах, не превышающих 60-70°C) комплексом высокоактивных ферментов и сбраживалось дрожжами. За счет комбинации методов глубокой механической и биохимической обработки исключалась одна из классических стадий спиртового производства – разваривание (при производстве пищевого этанола) или химического гидролиза (при производстве топливного этанола). Кроме того в сусле, полученном из ультрадисперсных частиц растительного сырья интенсивнее шли биохимические процессы (время брожения сокращалось в среднем на 6 часов – до 66 ч, вместо классических 72 ч) и накапливалось больше спирта. Все вышперечисленное позволяет сократить энергозатраты на стадиях подготовки и гидролиза сырья, а также снизить себестоимость готовой продукции.

## **Выделение галотолерантных нефтеокисляющих бактерий – продуцентов биосурфактантов из прибрежного шельфа северной Кубы**

*Баутиста Х.<sup>1</sup>, Эрнандес-Гомес Т.<sup>2</sup>, Кардинале М.<sup>3</sup>, Колпаков А.И.<sup>1</sup>, Багаева Т.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, [HBEspinoza@kpfu.ru](mailto:HBEspinoza@kpfu.ru)

<sup>2</sup>Научно-исследовательский центр нефтяной промышленности, Гавана, Куба

<sup>3</sup>Институт прикладной микробиологии Гиссенского Университета им. Ю.Либига Гиссен, Германия

В настоящее время заметно устойчивое повышение интереса к эмульгирующей, солюбилизующей, антиадгезивной и детергентной активности веществ, синтезируемых микроорганизмами. Углеводородное (нефтяное) загрязнение природной среды является особенно опасным по сравнению с прочими химическими загрязнениями, что связано с высокой токсичностью и миграционной способностью отдельных компонентов нефти. В морской среде присутствие углеводородов вызывает долгосрочное неблагоприятное воздействие на живые организмы. Цель настоящей работы – молекулярная идентификация новых продуцентов биосурфактантов с широким спектром функциональной активности, выделенных из прибрежного шельфа северной Кубы (CUPET, Куба). Накопительные культуры, выращенные на синтетической морской воде (synthetic sea water, SSW) с внесением 1% сырой нефти с последующей процедурой обогащения дали возможность выделения шести нефтеокисляющих микроорганизмов, способных использовать сырую нефть как единственный углеродный источник в SSW.

Отобранные нефтеокисляющие бактериальные культуры были очищены до монокультур. Для каждого изолята был установлен диапазон концентрации водородных ионов и NaCl. Было отобрано три изолята, обладающих способностью расти в широком диапазоне pH 5.0–10.0, концентрации соли 1-10% и температуре от 10°C до 50°C; подобраны оптимальные условия их роста. О приросте биомассы судили по количеству культивируемых бактерий после высева на агаризованную питательную среду Zobell (ZMA; Himedia, Индия). Родовая принадлежность штаммов была определена с использованием MALDI TOF Biotyper. Три выделенных штамма, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Aeromonas veronii* были проверены на продукцию биосурфактантов, охарактеризованных в тестах по измерению эмульгирующей активности, определению поверхностного натяжения и гидрофобности поверхности клеток. Было показано, что наибольшей активностью обладал штамм *B. subtilis*, оптимально растущий при концентрации соли 3%, соответствующей средней концентрации в морской воде, и температуре 50°C и имеющий высокие показатели эмульгирующей активности (60%). После 30 суток культивирования данного штамма на МПБ была выделен и очищен комплекс биосурфактантов. Два других штамма, *B. licheniformis* и *A. veronii*, обладали несколько сниженными характеристиками.

На основании полученных результатов можно рекомендовать интродукцию штаммов как в монокультуре, так и в составе консорциума, в загрязненную углеводородами морскую воду для элиминации поллютантов. Кроме того, изолированный комплекс биосурфактантов в перспективе также может быть использован для борьбы с нефтезагрязнением.

## Эффективные микроорганизмы чернозема выщелоченного и перспективы их использования в сельском хозяйстве

Безлер Н.В., Сумская М.А., Петюренко М.Ю., Кислинская Е.Г.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара  
им. А.Л. Мазлумова, Воронежская обл., п. ВНИИСС, vniiss@mail.ru

Почвенные микроорганизмы Красильников Н.А. (1953) рассматривал в единой системе с высшими растениями. Работами почвенных микробиологов было показано, что микроорганизмы участвуют практически во всех почвообразовательных процессах и обеспечивают питание и защиту растений.

За последние десятилетия численность и видовое разнообразие почвенных микроорганизмов сократилось из-за использования в сельскохозяйственном производстве высоких доз пестицидов. Одновременно стали наблюдаться эпифитотии культурных растений. Одним из направлений решения этих проблем является поиск, изучение и использование аборигенных штаммов эффективных микроорганизмов различного спектра действия.

Источником биологического азота в почве, являются прокариоты, способные фиксировать молекулярный азот атмосферы. В корневой зоне не бобовых растений обитают микроорганизмы, фиксирующие азот и относящиеся к разным систематическим группам: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Erwinia*.

По результатам идентификации бактерий изолированных из чернозема выщелоченного, ризопланы и ризосферы сахарной свеклы установлено, что в почве сосредоточено 15, в ризосфере – 31, в ризоплане – 54% представителей рода *Pseudomonas*. С помощью ПЦР анализа для выявления гена *nifH*, являющегося маркером для подтверждения способности бактерий фиксировать азот атмосферы, установили его наличие у штаммов *Pseudomonas sp. 110* и *P. fluorescens 116*. Это подтвердили и результаты изучения накопления щелочногидролизующего и нитратного азота в почве при интродукции этих бактерий.

Для восстановления естественных механизмов регуляции фитосанитарного состояния посевов сахарной свеклы, перспективно использовать аборигенные штаммы *Bacillus subtilis*, многие из которых являются антагонистами фитопатогенов.

Установлено, что выделенные из чернозема выщелоченного штаммы *Bacillus subtilis 20* и *17* подавляют развитие возбудителей корнееда и мучнистой росы, способствуя устранению этих заболеваний у сахарной свеклы. Они наиболее перспективны для использования в агроценозе сахарной свеклы.

## Особенности использования ризосферных бактерий для повышения эффективности микроразмножения растений

Бурыгин Г.Л.

Институт биохимии физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов,  
buryingl@gmail.com

Коммерческие бактериальные препараты активно используются в агроботехнологии для повышения урожайности многих сельскохозяйственных культур. Однако при микроразмножении растений *in vitro* для ускоренного получения оздоровленного посадочного материала применение ризосферных бактерий практически не используются. В данной работе на основе физиолого-биохимических особенностей ризосферных бактерий 25 штаммов родов *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* и *Rhizobium* разработаны варианты инокуляции микрорастений *in vitro*, позволяющие более полно реализовать рост-стимулирующий потенциал ризобактерий без их негативного влияния на рост растений при микроразмножении.

Предлагаемые варианты инокуляции различаются между собой по следующим параметрам: 1) возрастом микрорастений (определяется метаболическим обменом между растительным и бактериальным симбионтами при культивировании); 2) концентрацией инокулята (зависит от активности бактерий как продуцентов биологически-активных веществ);

3) составом и консистенцией питательной среды для культивирования растений (в зависимости от морфологических и биохимических характеристик бактерий). Также важными аспектами успешной колонизации ризосферными бактериями микрорастений были специфические фитоиммунные реакции на присутствие микроорганизмов в среде, обусловленные особенностью их поверхностных структур (флагеллинов, липополисахаридов и капсульного материала).

В результате внедрения в практику подходов, обоснованных на физиолого-биохимических особенностях ризобактерий, удалось получить эффективную ассоциацию бактерий *Azospirillum brasilense* с микрорастениями вида смолевки меловой (редкий вид, эндемик), что повысило приживаемость растений в почве в 1,5-2 раза. Иннокуляция *in vitro* бактериями *Ochrobactrum cytisi* увеличивала в 2-3 раза площадь листьев и на 20-30% урожайность растений картофеля. Также отмечено повышение ростовых характеристик и приживаемость древесных пород культурных растений в ассоциации с ризобактериями родов *Azospirillum* и *Rhizobium*.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №16-04-01444.*

## **Перспективы интеграции микробных баз данных и каталогов микробных коллекций для развития биотехнологии**

*Василенко А.Н., Ступарь О.С., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Озерская С.М.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино, vasilenko@ibpm.pushchino.ru

Проведен анализ тематики и структуры более 5500 биологических баз данных Наук о Жизни (Databases of Life Sciences) с акцентом на микробные базы данных (БД). Настоящее исследование выполнено с целью нахождения эффективной схемы решения следующих задач:

1. сделать сведения о микроорганизмах, представленные в каталогах микробных коллекций, видимыми и доступными из системы БД Наук о Жизни,
2. сделать сведения, собранные в микробных БД Наук о Жизни, видимыми и доступными из каталогов микробных коллекций.

Предоставление информации предполагается в форматах:

- а) проведение поиска и обеспечение доступа при работе человека (человек – БД),
- б) проведение поиска и обеспечение доступа при работе компьютера (компьютер – БД).

Ключевой целью было выявление БД, технологически перспективных для прикладных областей, таких как: фармакология, медицина, сельское хозяйство, виноделие, производство пива и пищевых продуктов, биоремедиация и др.

Проанализирована большая часть БД Наук о Жизни, доступных Online, на которые есть ссылки в информационных системах, таких как Biosharing, Bioinformatics Links Directory, MetaBase, BioMedBriges and ELIXIR lists, ExPASy, NAR, а также и в других обнаруженных нами источниках. Каждая БД в итоге была представлена именем, акронимом, адресом URL, годом последней коррекции, прикладной областью, разработчиком (изготовителем), индикатором присутствия сведений о микроорганизмах. БД с микробными сведениями проанализированы детальнее: список партнерских баз данных, список использованных онтологий, ключевые слова, характеризующие содержание базы данных: chemistry, diseases, genes, proteomics, taxonomy и др.

В докладе представлены результаты проведенной работы, в итоге которой собрана база метаданных со сведениями о 2629 БД Наук о Жизни, из них 1094 со сведениями о микроорганизмах. Сведения о партнерских БД позволили вычислить показатели уровня интеграции каждой конкретной БД, а именно установить, сколько БД ссылаются на конкретную БД в качестве партнера и на сколько партнерских БД ссылается сама конкретная БД. Показатели уровня интеграции позволили нам найти минимальное число интеграционных контрактов, обеспечивающих коллекционным каталогам приемлемый уровень интеграции в систему БД Наук о Жизни. Полученные результаты могут быть использованы для увеличения числа пользователей коллекций микроорганизмов, поиска продуцентов биологически активных веществ, при разработке различных биотехнологических процессов и в других областях, перспективных для биотехнологии.

## Экологически безопасное производство наночастиц микроорганизмами

Воейкова Т. А.<sup>1</sup>, Журавлева О. А.<sup>1,2</sup>, Булушова Н. В.<sup>1</sup>, Вейко В. П.<sup>3</sup>, Исмагулова Т. Т.<sup>4</sup>, Лупанова А. Н.<sup>5</sup>, Шайтан К. В.<sup>4,6</sup>, Дебабов В. Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции  
промышленных микроорганизмов, Москва

<sup>2</sup>Аграрно-технологический институт РУДН, Москва

<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии, Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва

<sup>4</sup>МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>5</sup>Институт биологии гена РАН, Москва

<sup>6</sup>Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва

Биологический метод получения наночастиц металлов, их оксидов и солей с помощью микроорганизмов является альтернативой физико-химическим методам, поскольку осуществляется при нормальной температуре, давлении и без использования токсичных веществ. Метод «зеленого синтеза» наночастиц экологически безопасен, менее энергозатратен, позволяет получать дисперсные наночастицы с узким распределением по размеру, обеспечивает природную стабильность наночастиц в водных суспензиях. Стабильность наночастиц достигается за счет адсорбции на поверхности наноструктур белков («белковой короны») и других биополимеров, синтезируемых клетками.

В представленной работе методом биосинтеза с использованием бактерий различных таксономических групп (*Shewanella oneidensis* MR-1, *Escherichia coli* K12 и *Bacillus subtilis* 168) в аэробных условиях, в 1 мМ водном растворе солей металлов ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ) и источников серы ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ ) получены наночастицы сульфидов металлов  $\text{Ag}_2\text{S}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{ZnS}$ . Анализ наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии показал, что частицы имеют сферическую форму и средний диаметр от  $8 \pm 2$  нм до  $10 \pm 2$  в зависимости от штамма. Показано, что наночастицы покрыты белковыми молекулами, состав которых индивидуален и постоянен для каждого из используемых штаммов.  $\zeta$ -потенциал и эффективный диаметр наночастиц, определяемые методом динамического светорассеяния, различаются по величине в зависимости от «белковой короны». Сравнительный анализ электрофореграмм белков в полиакриламидном геле из культуральной жидкости бактерий и белков, снятых с поверхности наночастиц, показал, что независимо от химической природы наночастиц, на их поверхность адсорбируются только белки определенного состава, т.е. существует специфичность и избирательность адсорбции белков на поверхность наночастиц. Методом МАЛДИ-ТОФ/ТОФ идентифицированы основные белки, и выявлена гетерогенность белкового покрытия наночастиц. Показано, что все белки, покрывающие поверхность наночастиц, являются белками внешней оболочки или цитоплазматической мембраны исследованных бактерий. Получение биогенных наночастиц с различным и определенным составом белковых молекул на поверхности является перспективным направлением, и данная работа иллюстрирует этот подход.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00471), Программы Президиума РАН (№ 24), с использованием аналитических методов просвечивающей электронной микроскопии на оборудовании ЦКП МГУ им. М. В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

### Штамм *Streptomyces* sp. IB2016I91-2, выделенный из байкальского эндемичного моллюска *Benedictia baicalensis* – продуцент ангуциклинового антибиотика рабеломицина

Войцеховская И. В.<sup>1,2</sup>, Аксёнов-Грибанов Д. В.<sup>1,2</sup>, Протасов Е. С.<sup>1</sup>, Лужецкий А. Н.<sup>3</sup>,  
Тимофеев М. А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биологии, irina.voytsekhovskaya@gmail.com

<sup>2</sup>Байкальский исследовательский центр

<sup>3</sup>Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS)

Биологические активные соединения, обладающие широким спектром действия, представляют коммерческий интерес для современной биофармацевтики. Стоит отметить, что актинобактерии являются эффективным источником биологически активных соединений. Так, насчитывается около 10 000 противомикробных соединений, продуцируемых актинобактериями из рода *Streptomyces*. Наряду с традиционно изученными экосистемами по поиску биологически активных соединений, с каждым годом растет актуальность в поиске новых соединений из малоизученных районов мира, которые могут представлять собой источники обнаружения новых соединений. Одной из наиболее необычных и неисследованных экосистем является древнейшее пресноводное озеро Байкал, фауна которого насчитывает более 2600 видов, 80% из которых являются эндемиками.

В ходе исследования из байкальского эндемичного моллюска *Benedictia baicalensis* (Gerstfeldt, 1859), собранного с глубины 50 м, был выделен штамм актинобактерии, относящийся к роду *Streptomyces* sp. Данный штамм проявил выраженную антибиотическую активность по отношению к грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 66337. С применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией с последующей дерепликацией соединений было установлено, что данным штаммом продуцируется ряд ангуциклинов, в т.ч. и рабеломидин ( $m/z$  339.08609 [M+H];  $m/z$  361.06813 [M+Na];  $m/z$  677.16533 [2M+H];  $m/z$  699.14706 [2M+Na]), который был очищен в ходе препаративной жидкостной хроматографии при культивировании штамма *Streptomyces* sp. IB2016I91-2 на среде SM27N. В ходе работ было выделено 0.55 мг/л чистого соединения при культивировании штамма в 10 литрах среды. Структура данного соединения была расшифрована с помощью метода ядерного магнитного резонанса. Данный антибиотик обладает широким спектром биологических активностей: противоопухолевой, противовирусной, а также антибактериальной.

*Настоящее исследование проведено при финансовой поддержке грантов МИНОБРНАУКИ РФ (6.9654.2017/8.9), РФФИ (16-34- 60060, 16-34- 00686), РНФ (17-74- 20041), ФГБОУ ВО «ИГУ» и Германской службой академических обменов.*

## **Сверхпродукция фермента ациламидазы в *Rhodococcus rhodochrous* связана с влиянием металлозависимых регуляторов экспрессии**

*Гречишников Е.Г., Шемякина А.О., Лавров К. В., Яненко А.С.*

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, yanenko@genetika.ru

Ранее нашей группой было впервые показано усиление экспрессии в родококках гена ациламидазы в присутствии ионов кобальта, и обнаружен ген транскрипционного регулятора *CblA*, участвующего в кобальт-зависимой регуляции экспрессии. Фермент ациламидаза перспективен для промышленного биокаталитического получения ценных акриловых мономеров – N-замещённых акриламидов. Изучение механизма регуляции его экспрессии создаёт основу для конструирования промышленного биокатализатора на основе бактерий *R. rhodochrous*.

В настоящей работе для детального изучения кобальт-зависимой экспрессии были сконструированы штаммы *R. rhodochrous*, содержащие в хромосоме 4 варианта кластера ациламидазы. Каждый из них содержал промотор (P<sub>нг</sub>), ген ациламидазы (*aam*), а также варианты делеций двух генов: металлозависимого регулятора *cblA* и кобальтового металлошаперона *nhmG*. Влияние на экспрессию оценивалось по уровню ациламидазной активности клеток, содержанию целевого белка в клетке, и уровню транскрипции гена ациламидазы, измеренному с помощью количественной ПЦР.

В двух штаммах, где присутствовал ген *cblA* (полный кластер P<sub>нг</sub>-*aam*-*nhmG*-*cblA* и кластер с делецией *nhmG* P<sub>нг</sub>-*aam*-*cblA*), степень индукции экспрессии кобальтом составляла 2-5 раз. В двух штаммах с делецией *cblA* (P<sub>нг</sub>-*aam*-*nhmG* и P<sub>нг</sub>-*aam*) кобальт-зависимая регуляция экспрессии отсутствовала. При этом в штамме с делецией обоих генов *cblA* и *nhmG* уровень экспрессии был в 10 раз ниже, чем у остальных вариантов. Таким образом, для осуществления кобальт-зависимой регуляции необходимо и достаточно присутствие *cblA*. В то же время, сниженная активность штамма с делецией *nhmG* и *cblA*, указывает на возможную роль *nhmG* в экспрессии. Для всех вариантов уровни ациламидазной активности, содержания целевого белка



и уровни транскрипции коррелировали. В штаммах с максимальным уровнем ациламидазной активности количество целевого белка превышало 25% от всех растворимых белков, что соответствует наиболее высоким показателям, известным для бактерий.

## **Перспективы использования электрофизических методов для определения антибактериальной активности антибиотиков**

*О.И. Гулий<sup>1,2,3,4</sup>, Б.Д. Зайцев<sup>3</sup>, И.А. Бородина<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов,  
gulyi\_olga@mail.ru,

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов

<sup>3</sup>Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАН, Саратов

<sup>4</sup>Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А.Котельникова РАН,  
Саратов

Рост устойчивости возбудителей инфекций к антибиотикам (антибиотикорезистентность) рассматривается в разных странах мира как угроза национальной безопасности. ВОЗ относит проблему антимикробной резистентности в число наиболее приоритетных, о чем свидетельствует разработка «Глобальной стратегии ВОЗ по сдерживанию резистентности к антимикробным препаратам». Одним из основных вопросов при изучении адаптации микробов к действию антибиотиков является определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам. Поэтому разработка новых технологий и методов определения чувствительности бактерий к действию антимикробных препаратов весьма актуальна. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам является важнейшей и в то же время едва ли не самой трудоемкой и затратной процедурой в микробиологической лаборатории. В этом плане электрофизические методы, в том числе метод акустического анализа, являются достаточно перспективными, и они все чаще привлекают внимание ученых для исследования различных биологических взаимодействий.

Впервые продемонстрирована возможность определения антибактериальной активности антибактериальных препаратов на примере □□лактамовых антибиотиков и полимиксина методом электроакустического анализа. Исследовано влияние амоксициллина и полимиксина на изменение физических параметров суспензии микробных клеток *Escherichia coli* ряда штаммов. В качестве биологического датчика использовался пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, содержащий жидкостной контейнер емкостью порядка 1 мл. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора, нагруженного суспензией чувствительных клеток при добавлении антибиотиков, значительно отличаются от зависимостей резонатора с контрольной суспензией микробных клеток без добавления препаратов. В случае суспензии устойчивых к антибиотику клеток указанные зависимости практически не различаются. Показана возможность регистрации аналитического сигнала при проведении анализа в суспензиях с проводимостью до 15 □См/см, что является перспективным с точки зрения применения на реальных образцах. Представленные результаты демонстрируют возможность регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки и оценки их антибактериальной активности электроакустическим методом.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16-07-00818).*

### **Биосенсоры и биотопливные элементы.**

#### **Исследования, ориентированные на практическое применение**

*Гуторов М.А., Решетлов А.Н.*

<sup>1</sup>ООО «ГАММА», Зеленоград, mikhailgutorov@gmail.com

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушино

В работе рассмотрены исследования по созданию электрохимических биосенсорных анализаторов микробного типа и микробных биотопливных элементов. Исследования являются характерными для проводимых как за рубежом, так и в Российской Федерации работ. Внимание уделено прежде всего работам поискового плана, которые, не являясь внедренными в практику в настоящее время, тем не менее представляют интерес своей новизной и степенью парадоксальности. Особое внимание уделено разработкам, проводимым в Российской Федерации. Основным направлением в использовании клеток микроорганизмов являлась детекция спиртов, сахаров и токсичных соединений, а также оценка индекса биохимического поглощения кислорода (БПК). Полученные результаты будут внедряться в практику, для чего разрабатывается «Анализатор» - программно-аппаратное устройство для контроля концентраций основных веществ (крахмал, глюкоза, этанол) бродильного производства.

В области топливных элементов внимание уделялось использованию углеродных наноматериалов, в частности терморасширенного графита, хорошо известного, но не применявшегося ранее в сочетании с биоматериалами. Рассмотрено создание анода топливного элемента на основе мембранных фракций бактерий рода *Gluconobacter*. Найдено, что каталитическое окисление этилового спирта мембранными фракциями может происходить в безмедиаторном режиме. Для микробного топливного элемента создана и опробована система конвертерного накопления заряда, значительно поднимающая выходное напряжение.

## **Новое поколение биокатализаторов для синтеза L-аспарагиновой кислоты**

*Дербиков Д.Д., Новиков А.Д., Синолицкий М.К., Яненко А.С.*

ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, den\_derb@mail.ru

В настоящее время наиболее эффективным способом получения L-аспарагиновой кислоты является биокаталитическая конверсия фумарата аммония с помощью фермента аспартазы. В качестве биокатализатора для синтеза L-аспарагиновой кислоты, как правило, используются бактериальные клетки с высокой аспартазной активностью, иммобилизованные на разных носителях. С целью создания более эффективных биокатализаторов было проведено конструирование штаммов, обладающих высокой аспартазной активностью с использованием методов геной инженерии и рекомбинирования, включая клонирование гена аспартазы в составе мультикопийных векторов, клонирование гена аспартазы в составе хромосомы под контролем сильных промоторов, а также удаление генов фумараз, контролирующих образование яблочной кислоты - основного побочного продукта синтеза L-аспарагиновой кислоты.

Было показано, что клонирование гена аспартазы под контролем сильных фаговых промоторов в хромосоме в комбинации с удалением побочной фумаразной активности позволяет повысить активность штамма в более чем в 40 раз, снизив при этом образование побочного продукта - яблочной кислоты - с 34 г/л до 1,5 г/л. Проведена иммобилизация полученного штамма в различных условиях и показано, что в оптимальных условиях у полученного биокатализатора по сравнению с применяющимся в настоящее время в промышленности вдвое возрастает период полуинактивации, а также в 7 раз возрастает продуктивность.

Полученные результаты свидетельствуют о значительном потенциале применения полученных биокатализаторов в промышленном получении L-аспарагиновой кислоты.

## **Биотрансформация модифицированных стероидов в перспективные прекурсоры**

*Добня Д.В., Хомутов С.М., Шутов А.А., Донова М.В.*

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

Важный этап промышленного производства стероидных лекарственных фармацевтических субстанций представляет собой биотрансформацию растительных стероидов (фитостерина) актинобактериями в универсальные стероидные полупродукты (прекурсоры). Из них, комбинируя стадии химического синтеза и биохимические модификации, получают широкий спектр стероидных гормонов. Ряд традиционных прекурсоров представлен всего тремя 3,17-дикето-4-ен-стероидами – продуктами окислительной деградации боковой цепи стероидов и неизбежной сопутствующей модификации их ядра. Вместе с тем, естественные конфигурации молекул стероидов растений и грибов (эргостерина) – 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен- и 3 $\beta$ -гидрокси-5,7-диен- являются необходимыми для получения ряда физиологически активных стероидов, но утрачиваются в процессе биотрансформации. Это приводит к необходимости их воссоздания многостадийными химическими синтезами. Химическая модификация стероидов позволяет защитить конфигурацию стероидов при их биоконверсии микроорганизмами и сократить общее количество технологических стадий, необходимых для получения целевых лекарственных субстанций, а также открывает возможность получения новых перспективных стероидных прекурсоров.

Целью данной работы было изучение возможности и особенностей микробиологической деградации бактериями *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816Д алифатической боковой цепи при С-17 у нескольких синтетических стероидоподобных субстратов, несущих различные замещающие группы по положениям С-6 и С-3.

Изучена биотрансформация смесей О-метоксиметилированных растительных стероидов в естественных пропорциях. Показана возможность сохранения хирального центра при С-3 и 5(6)-двойной связи молекул субстрата. Новые данные позволили получить дегидроэпиандростерон (ДГЭА) из фитостерина комбинированным трехстадийным методом. Введение альтернативного заместителя при С-3 приводило к накоплению ДГЭА непосредственно в среде биотрансформации.

Использование в качестве субстрата биотрансформации метоксиметилированного эргостерина позволило сохранить систему сопряженных двойных связей в молекуле субстрата и получить О-метоксиметокси-андрост-5,7-диен-17-он, относящийся к ряду дельтаноидов.

Впервые была показана возможность биотрансформации 6-метилен-холест-4-ен-3-она (6МХН) в 6-метилен-андрост-4-ен-3,17-дион с более высоким выходом (>90%) и селективностью, чем для естественного субстрата.

Вместе с тем, такие синтетические субстраты как 6-фениламино-метил-холест-4-ен-3-он и 6-диметиламино-метил-холест-4-ен-3-он, оказались токсичными для микобактерий, а биотрансформация стероидов с бензоильным заместителем при С-3 была неэффективной и сопровождалась гидролизом сложно-эфирной связи, образованием свободных стероидов и накоплением бензойной кислоты.

Полученные результаты важны для понимания особенностей биоконверсии химически дериватизированных стероидов и могут быть применены в качестве основы новых методов получения ценных стероидных прекурсоров и фармацевтических субстанций.

## **Создание штамма *Mycobacterium smegmatis* – продуцента ценных изопреноидов**

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

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН  
Пушино, bragory@yandex.ru

Катаболизм стероидов у актинобактерий в настоящее время активно изучается как в связи с поиском эффективных антибактериальных (противотуберкулезных) лекарственных средств, так и с целью получения ценных предшественников для синтеза фармацевтических субстанций. Широко используются в биотехнологии полученные с помощью классического мутагенеза штаммы актинобактерий, трансформирующие стероиды в производные гексагидроинданона – 3 $\alpha$ -Н-4 $\alpha$ -[3'-пропионат]-7 $\beta$ -метилгексагидро-1,5-индандион (ГИП) и его циклическую форму, известную как ситолактон. Основной структуры данных соединений являются кольца С и D стероидного ядра.

В течение последнего десятилетия накапливаются и систематизируются данные о молекулярно-генетических основах функционирования путей катаболизма стероидов у актинобактерий. Недавно был идентифицирован ряд генов, играющих ключевую роль в окислении остатка стероидной молекулы на поздних стадиях катаболизма, что позволяет создавать штаммы-продуценты производных гексагидроинданона методами метаболической инженерии.

Данная работа направлена на получение штаммов *Mycobacterium smegmatis* с инактивированными генами, контролирующими поздние стадии окисления стероидной молекулы, анализ и оценку биотехнологического потенциала мутантов.

Нами были созданы необходимые генетические конструкции и осуществлена направленная инактивация генов ацил-КоА синтетазы и гипотетической ацил-КоА гидролазы, относящейся к KstR2-регулону.

У полученных мутантных штаммов была выявлена способность к биотрансформации холестерина с накоплением единственного мажорного продукта, который не был идентичен ГИП или ситолактону. Этот продукт был очищен, его молекулярная масса, химическая формула, структура и стереохимия были подтверждены с использованием методов масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения, протонной,  $^{13}\text{C}$  и двумерной (COSY, ROESY, HMBC, HMQC, NOE) ЯМР-спектроскопии.

Показано, что продукт обладает молекулярной массой 224, имеет формулу  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$  и в кристаллической форме представлен единственным стереоизомером – 4а-гидрокси-ба-метилдекагидроциклопента[*f*]хромен-7(8H)-оном.

Данное соединение не является типичным интермедиатом стероидного катаболизма и в доступной литературе отсутствуют сведения о штаммах, способных накапливать его в качестве основного продукта. Высокий мольный выход (~95%) и особенности структуры молекулы продукта (гетероциклический полукеталь) позволяют предположить, что он может стать перспективным прекурсором для модульного синтеза ценных биологически активных соединений, в частности, производных эстрогена.

## Очистка ПХБ-загрязненных почв с использованием аэробных бактерий-деструкторов

Егорова Д.О., Плотникова Е.Г.

Пермский ФИЦ Уральского отделения РАН, daryao@rambler.ru

Одной из серьезных экологических проблем современности является восстановление территорий (в частности, почвенного покрова), загрязненных химическими соединениями антропогенного происхождения. Известно, что одним из наиболее перспективных методов очистки *in situ* является биоремедиация с использованием в качестве биологических агентов штаммов аэробных бактерий.

Уровень загрязненности почв полихлорированными бифенилами (ПХБ) на территориях их производства и применения варьирует от десятков до сотен ПДК. Кроме этого, ПХБ обнаружены в песках Сахары и во льдах Антарктики, где никогда не было промышленных производств. Уникальные физико-химические свойства ПХБ обусловили их широкое применение в различных технологиях. Однако в конце 20 века установлено, что ПХБ наносят серьезный вред окружающей среде и человеку, что послужило основанием для включения их в список «Стойких органических загрязнителей» (Стокгольмская конвенция, 2001г.), подлежащих полному уничтожению. В связи с этим особую важность приобретает поиск и внедрение биотехнологий, позволяющих восстанавливать ПХБ-загрязненные территории.

Цель исследования – изучить возможность очистки почвы, загрязненной ПХБ, методом аугментации штаммов аэробных бактерий, обладающих деградативной активностью к бифенилу/хлорированным бифенилам.

В качестве биологического агента для очистки ПХБ-загрязненной почвы в процессе исследования предложены три ассоциации активных штаммов деструкторов: а) *Rhodococcus ruber* P25 и *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, б) *R. ruber* P25 и *Microbacterium* sp. B51, в) *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a, а также индивидуальные штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7 и *Rhodococcus wratislaviensis* CH628. Данные штаммы обладают высоким

деградативным потенциалом к широкому спектру конгенов ПХБ, при этом они осуществляют полную минерализацию молекулы ПХБ без накопления токсичных метаболитов.

Установлено, что внесение в почву, длительное время загрязненную ПХБ (18 ПДК), ассоциации штаммов *R. ruber* P25 и *R. wratislaviensis* KT112-7 позволяет снизить содержание загрязнителя за 90 суток до 1.5 ПДК. Аналогичный эффект был показан при аугментации в данную почву штамма *R. wratislaviensis* CH628. Штамм *R. wratislaviensis* KT112-7 осуществляет очистку почвы, содержащей промышленные смеси полихлорбифенилов в концентрации 80 ПДК за 60 суток. Эксперименты с модельным загрязнением почвы коммерческими смесями ПХБ показали, что бактериальные ассоциации *R. ruber* P25/*Microbacterium* sp. B51 и *Rhodococcus* sp. B7a/*Rhodococcus* sp. G12a осуществляют очистку почвы от ПХБ до допустимых показателей за 60 – 90 дней при начальном содержании загрязнителя 1500 – 4500 ПДК.

Таким образом, установлена возможность эффективной очистки ПХБ-загрязненных почв методом биоремедиации с использованием уникальных бактериальных штаммов и их ассоциаций.

*Работа поддержана Программой УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология», проект № 15-4-4-13.*

## **Биоремедиация почв, загрязненных органофосфонатами**

*Ермакова И.Т., Шушкова Т.В., Свиридов А.В., Винокурова Н.Г., Зеленкова Н.Ф.,  
Эпиктетов Д.О., Леонтьевский А.А.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино, [ermakova@ibpm.pushchino.ru](mailto:ermakova@ibpm.pushchino.ru)

Органофосфонат глифосат (ГФ) применяется как действующий компонент ряда популярных неселективных гербицидов. Его производство составляет около 1 млн. тонн в год и постоянно расширяется в связи с созданием генетически модифицированных ГФ-резистентных культурных растений. ГФ длительное время сохраняется в почве преимущественно за счет сорбции на почвенном матриксе и миграции по почвенным горизонтам. Имеются данные, что он может влиять на репродукцию животных, оказывает гепатотоксическое и тератогенное действие. Воздействуя на различные составляющие почвенной микрофлоры, ГФ изменяет состав природных экосистем. Устойчивость ГФ обеспечивается наличием прочной углерод-фосфорной (С-Р) связи. Основным способом деградации ГФ в природе является расщепление этой связи ферментными системами микроорганизмов. Степень минерализации гербицида в почве определяется его биодоступностью, а также количеством и активностью микробной популяции, содержащей природные штаммы-деструкторы ГФ.

В лаборатории микробной энзимологии ИБФМ РАН создана коллекция бактерий-активных деструкторов органофосфонатов, которые были выделены из почв, длительное время обрабатываемых ГФ. Подобраны условия их поддержания с сохранением высокой деструктивной активности, оптимизирован процесс деструкции ГФ в условиях периодического культивирования, изучены ростовые и деструктивные характеристики штаммов, а также разнообразие и особенности функционирования биохимических систем расщепления С-Р связи. Путем интродукции штаммов-деструкторов *Achromobacter* sp. Kg 16 (ВКМ В-2534D) и *Ochrobactrum anthropi* GPK 3 (ВКМ В-2554 D) впервые в полевых условиях проведена биоремедиация почвы при содержании в ней ГФ, в 100 раз превышающем технологическую норму внесения гербицида. Высокая степень очистки (до 80 % от начального уровня) подтверждена данными химического анализа, снижением интегральной токсичности и восстановлением биологической активности почвы.

Результаты изучения физиологических и биохимических особенностей разных штаммов-деструкторов позволили предложить схему их взаимодействия внутри микробного сообщества в ГФ-загрязненной почве, которая объясняет стратегии адаптации микроорганизмов в таких сайтах, а также создает основу для разработки биотехнологий ремедиации различных сред, загрязненных органофосфонатами

## Отечественные диагностические латексные тест-системы: разработка и практическое использование

Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К.

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», Роспотребнадзора, Оболенск,  
info@obolensk.org

Диагностические латексные тест-системы – повседневный инструмент для первичной идентификации целевых микроорганизмов. Они характеризуются простотой исполнения и сравнительно высокой специфичностью и чувствительностью. В настоящее время многие мировые фирмы производят сотни различных латексных тест-систем для идентификации большой группы патогенов. В Российской Федерации разработка и производство аналогичных препаратов находятся на начальном этапе.

В Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии в Оболенске разработаны и реализуются во многие регионы Российской Федерации антительные латексные тест-системы для идентификации *Legionella pneumophila* серотипа 1 (детекция основного мембранного белка р29), *Listeria monocytogenes* (детекция белка внешней мембраны р60), шига-токсин продуцирующих *Escherichia coli* серотипов O157:H7 и O104:H4 (детекция специфических липополисахаридов и жгутиковых антигенов), возбудителей гнойных менингитов *Haemophilus influenzae* типа b, *Streptococcus pneumoniae* и *Neisseria meningitidis* типов A, B, C и W135.

Разработаны, но пока не зарегистрированы, латексные тест-системы для идентификации *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*. Кроме того, разработаны и прошли лабораторные испытания комплексные тест-системы для выявления и идентификации *Listeria monocytogenes* и *Escherichia coli* O157:H7 в продуктах питания и клиническом материале, которые состоят из двух компонентов: латексной иммуномагнитной системы и ПЦР тест-системы. Комплексные тест-системы позволяют обнаружить возбудителей в исследуемом материале в течение 3-5 часов.

В ГНЦ ПМБ разработаны также две антигенные латексные тест-системы для серологической диагностики лептоспироза у домашних и сельскохозяйственных животных и сальмонеллёза у птиц.

Разработанные тест-системы успешно используются в диагностической работе лабораторий более чем в 20 регионах Российской Федерации.

Таким образом, наш опыт по разработке диагностических латексных тест-систем говорит о возможности в короткие сроки создать и начать производить в Российской Федерации необходимые для медицины и ветеринарии латексные тест-системы.

### Деструкция пищевых азокрасителей лактобациллами с пробиотическим потенциалом

Есакова А.А.<sup>1</sup>, Тактарова Ю.В.<sup>1</sup>, Гладченко М.А.<sup>2</sup>, Чердынцева Т.А.<sup>1</sup>, Котова И.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» Биологический факультет, Москва, aesakova@yandex.ru

Научный интерес к поиску микроорганизмов, обладающих способностью благоприятно воздействовать на организмы животных и человека, имеет важное значение для профилактических и терапевтических целей. Кроме того, исследования деятельности пробиотических бактерий актуальны для ряда промышленных направлений. Повсеместное использование в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности труднорастворимых искусственных азокрасителей представляет опасность для здоровья из-за аллергенности и токсичности, а также негативного влияния на микрофлору макроорганизма.

Нами была изучена способность ряда лактобактерий (*Lactobacillus* spp.) разлагать в анаэробных условиях наиболее применимые в промышленности азокрасители: пищевые красители - тартразин, понсо и Sunset Yellow, запрещенный к применению азоксалин и

технический текстильный краситель Methyl Red. В настоящей работе исследована возможность применения культур *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* и *L. delbrueckii* для биодеградации азокрасителей и изучения возможных интермедиатов и метаболитов этого процесса. Анализ расщепления азосвязи и содержания ароматических соединений в культуральной жидкости проводили путем спектрофотометрического сканирования в диапазоне волн от 200 до 600 нм. Проведена оценка роста культур с помощью нефелометрического метода. Показано, что на 1-2 сутки все культуры вступают в фазу экспоненциального роста и полностью выходят на стационарную фазу к 3 сут. По результатам исследований было показано, что азокрасители понсо и азоксифлюксин сильнее всего подавляют рост лактобацилл, кроме *L. delbrueckii*, которая меньше всего подверглась ингибированию этими веществами. Для этой культуры наблюдали её более активный рост при добавлении понсо (на 40% больше по сравнению с контролем). Эти же красители в меньшей степени подверглись деструкции. Азокрасители Methyl Red, Sunset Yellow и тартразин не ингибировали рост культур, при этом было отмечено частичное или полное их разложение. В процессе роста культур в среде чаще всего фиксировали образование метаболита, детектируемого на длине волны 259 нм, что соответствует сульфаниловой кислоте. Поскольку образующиеся метаболиты могут служить как субстратом для дальнейшего потребления микроорганизмами, так и ингибиторами их роста, необходимы дальнейшие исследования по определению их состава, разнообразия и влияния на наиболее активные культуры лактобактерий.

## **Разработка экспресс–тестов для микробиологического анализа пищевых продуктов**

Зайнуллина А.Р.<sup>1</sup>, Халиуллин Э.М.<sup>1</sup>, Яковлева Г.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «БИОКОНТРОЛЬ ГР», Казань

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Yakovleva\_galina@mail.ru

Санитарно-гигиеническая оценка продуктов питания согласно требованиями ГОСТов, республиканских и отраслевых стандартов и другой документации устанавливается на основе комплекса мероприятий, включающих в себя органолептические, физико-химические и микробиологические показатели. При микробиологическом анализе определяется два показателя: 1) общее микробное обсеменение (если при производстве продукта не используется специальная микрофлора, как, например, у молочно-кислых продуктов) и 2) санитарно-показательные микроорганизмы. Санитарно-показательные микроорганизмы являются постоянными обитателями естественных полостей тела людей и животных и вместе с выделениями организма поступают во внешнюю среду, где способны сохранять жизнеспособность Их наличие в пищевых продуктах является косвенным показателем, по которому можно судить о возможном присутствии патогенов. Стандартно в продуктах питания определяют энтеробактерии – представителей родов *Escherichia*, *Salmonella* и *Listeria*, причем их определение требует затрат времени и использования разнообразных сред. Имеющиеся на мировом рынке тесты для их определения обладают высокой стоимостью, что требует разработки отечественных систем в рамках программы импортозамещения. Нами разработаны новые экспресс–тесты (дипслайды) для качественного и количественного определения данных микроорганизмов в пищевых продуктах. Дипслайд представляет собой тест-пластину, на которую с обеих сторон нанесен слой агаризованных питательных сред, соответствующих требованиям Госфармакопеи XI, для определения *Escheichia coli* (Эндо-ГРМ), *Listeria monocytogenes* (L–PALCAM) и *Salmonella typhimurium* (XLD-агар). Сочетание сред и на одной пластине позволяет определять одновременно две группы санитарно-показательных бактерий за время, не превышающее суток, поскольку пластина в стерильной пластиковой пробирке готова к употреблению. Посев образца с использованием дипслайдов занимает всего несколько секунд и проводится методом отпечатков или методом погружения. Нами показано, что общее микробное число бактерий, выросших на дипслайдах, соответствует таковому при выращивании стандартными методами на чашках Петри. Проверка срока годности дипслайдов выявила, что они сохраняют качество в течение 6 месяцев, что особенно важно для массового использования в процессе производства пищевой продукции. Более того, дипслайды имеют определенное преимущество при анализе вязких образцов и образцов с содержанием масел, поскольку не требуют применения методики гомогенизации образцов. Совместно с ООО

«БИОКОНТРОЛЬ ГР» дипслайды внедрены в производство: используемые питательные среды прошли испытания и утверждены к массовому применению Центром гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан. Ориентировочная цена разработанных дипслайдов в 2-3 раза (в зависимости от курса валюты) ниже, чем для импортных аналогов.

## **Электрогенный потенциал термофильных и алкалофильных микробных матов, выделенных из гидротерм и содово-соленых озер Бурятии**

*Зайцева С.В.<sup>1</sup>, Юрьев Д.А.<sup>2</sup>, Дагурова О.П.<sup>1</sup>, Жданова Г.О.<sup>2</sup>, Стом Д.И.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН,  
г. Улан-Удэ, svet\_zait@mail.ru

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

Высокая эффективность передачи энергии за счет окислительно-восстановительных реакций в циклах углерода и серы делает микробные маты исключительными кандидатами для конкретных практических применений, в том числе, в микробных топливных элементах. В нашем исследовании мы использовали в качестве модельных систем микробные маты, отобранные в термальных источниках Кучигер и Умхей (Курумканский район, Республика Бурятия), в прибрежной зоне содово-соленых озер Верхнее Белое (Джидинский район, Республика Бурятия) и Сульфатное (Селенгинский район, Республика Бурятия). Микробный мат источника Кучигер был представлен придонными микробными обрастаниями, которые развивались при температуре 36°C и pH среды 9,8. По результатам пиросеквенирования гена 16S РНК в составе микробного мата источника Кучигер преобладали представители Proteobacteria (85.5% от числа классифицированных бактериальных последовательностей), из них наиболее многочисленными были серные бактерии рода *Thiothrix* (66.1 %). Кроме того, было выявлено присутствие в составе микробного мата бактерий из семейств Rhodocyclaceae и Comamonadaceae, аэробных палочковидных бактерий с широкими метаболическими возможностями.

Изучение электрогенной активности производили в разработанных макетах МТЭ (Патент на полезную модель № 151764 от 24 июня 2014). В качестве электродов (150±10×30±0,5 мм) использовали углеродную ткань «Урал» Т22Р (ОАО «Светлогорскхимволокно», Республика Беларусь). В качестве среды использовали карбонатный/бикарбонатный буфер 0,05 М с добавлением солей ортофосфорной кислоты и различных источников азота, pH – 9,6±0,1.

Среди исследуемых микробных матов наибольшей электрогенной активностью в микробных топливных элементах обладал термофильный микробный мат Кучигер-16, способный трансформировать азотсодержащие компоненты сточных вод с одновременной выработкой электричества. При использовании глюкозы в качестве источника углерода в МТЭ наибольшая максимальная мощность достигала 240 мВт/м<sup>2</sup> при максимальной силе тока 3727 мкА. Трансформация пептона в МТЭ оказалась эффективнее алкалофильным микробным матом Верхнее Белое-16, где максимальная мощность составила 267 мВт/м<sup>2</sup>, сила тока до 3823 мкА.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Бурятия в рамках научного проекта № 16-48-030881.*

## **Оптимизация условий культивирования для образования протеиназ – активаторов прекалликреина микромицетом *Aspergillus terreus* 2**

*Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,  
zvonaireva.es@gmail.com

Среди внеклеточных протеиназ, образуемых микромицетами рода *Aspergillus*, есть ферменты, способные активировать некоторые проферменты системы плазменного гемостаза человека – протеин С, фактор X, прекалликреин. Такие протеиназы могут найти применение в составе диагностических наборов для определения содержания в плазме крови



соответствующих проферментов, необходимого для корректного проведения терапии в случаях тромбозмболических осложнений.

Микромицет *Aspergillus terreus* 2 – один из продуцентов протеолитических ферментов – активаторов прекалликреина. Для увеличения секреции протеиназ-активаторов изучали влияние условий культивирования продуцента на их образование в глубинных условиях. Начальный pH среды и температуру культивирования устанавливали в диапазонах 4-9 и 25-34 °С, соответственно. Культивирование проводили на средах, содержащих в качестве единственных источников азота гидролизат рыбной муки и нитрат натрия, а также на среде, в которой присутствовали оба этих компонента (компоненты сред были подобраны ранее).

Результаты показали, что оптимальной для образования протеиназ – активаторов прекалликреина микромицетом *A. terreus* 2 является среда с гидролизатом рыбной муки и нитратом натрия, на ней же наблюдался лучший рост продуцента. Максимальная активность в культуральной жидкости была выявлена при культивировании микромицета при начальном значении pH 6.0-6.5 и температуре 28 °С.

На подобранной среде и при подобранных условиях культивирования проводили изучение влияния микроэлементов (солей натрия, кальция, железа, цинка) на секрецию протеиназ – активаторов прекалликреина, образуемых микромицетом *A. terreus* 2. Было показано, что внесение микроэлементов в среду культивирования не значительно влияло на образование изучаемых протеиназ.

Таким образом, были оптимизированы условия образования протеиназ – активаторов прекалликреина микромицетом *A. terreus* 2.

## Получение биопрепарата комплексного действия

*Ибрагимова С.А., Ревин В.В.*

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарёва,  
Саранск, [ibragimova-s@yandex.ru](mailto:ibragimova-s@yandex.ru)

В настоящее время большое внимание уделяется роли ризосферных бактерий в микробно-растительных сообществах. Массовая химизация, применяемая в сельском хозяйстве, наносит огромный ущерб окружающей среде, в связи с этим интенсивно внедряются биологические методы. Поиск и селекция новых высокоактивных штаммов микроорганизмов, а также оптимизация условий их культивирования является основной задачей при разработке технологий получения биопрепаратов для стимуляции роста и защиты культурных растений от фитопатогенов.

На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии выделен и задепонирован штамм бактерии *Pseudomonas aureofaciens* В-11634, обладающий ростостимулирующими и антагонистическими свойствами. На основе данного штамма и азотфиксирующей бактерии *Azotobacter vinelandii* Д-08 отработана технология получения высокоэффективного биопрепарата комплексного действия. Использование сахаросодержащих отходов при культивировании бактерий способствовало существенному удешевлению технологического процесса, что положительно повлияло на снижение себестоимости готового продукта.

При оптимизации условий культивирования был достигнут высокий титр жизнеспособных клеток в культуральной жидкости, обладающих максимальным синтезом активных метаболитов. Создание консорциума на основе ризосферных бактерий позволило расширить функциональные свойства препарата. При апробации в полевых условиях увеличение биологической урожайности злаковых культур составило от 7 до 20 %. Выявлено антагонистическое воздействие биопрепарата на широкий спектр возбудителей заболеваний растений (фузариоз, альтернариоз, фитофтороз, мучнистая роса, ризоктониозные, корневые гнили и др.).

За счет способности используемых бактерий синтезировать экзополисахариды исключается необходимость в использовании прилипателей при обработке семян. При этом образующаяся на поверхности зерна полисахаридная пленка создает оптимальные условия для развития, как бактерий, так и зародыша за счет дополнительного удержания влаги.

Создание инновационных биопрепаратов на основе консорциума бактерий позволит занять лидирующие позиции в области разработки агробiotехнологий и импортозамещения.

## Биоконверсия фитостерина в тестостерон рекомбинантными микобактериями

Карпов М.В.<sup>1,2</sup>, Стрижов Н.И.<sup>1</sup>, Суходольская Г.В.<sup>1</sup>, Николаева В.М.<sup>1</sup>, Фокина В.В.<sup>1</sup>,  
Шутов А.А.<sup>1</sup>, Донова М.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

<sup>2</sup> Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, mikemikekarp@mail.ru

Тестостерон (андрост-4-ен-17 $\beta$ -ол-3-он, Тс) является основным мужским половым гормоном, анаболическим стероидом, а также лекарством и предшественником других важных стероидных лекарственных средств. В настоящее время Тс получают четырехстадийным химическим синтезом из андрост-4-ен-3,17-диона (АД), получаемого микробиологической биоконверсией фитостеринов (Фс). Ранее использование штамма-продуцента андрост-1,4-диен-3,17-диона (АДД) *Mycobacterium neoaurum* ВКМ Ас-1816D позволило получить тестостерон из Фс за одну биотехнологическую операцию [1]. Однако полнота биоконверсии не превышала 50% уровня даже при низких нагрузках субстрата. Низкая эффективность целлюлозного микробного биокатализа для производства Тс путем отщепления боковой цепи стероидов зачастую связана с низкой восстановительной активностью бактериальных 17 $\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназ/редуктаз (17 $\beta$ -ГСД) [1,2].

Целью настоящей работы явилось получение рекомбинантных штаммов сапрофитных микобактерий, эффективно продуцирующих Тс из Фс.

В работе были использованы штаммы *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155  $\Delta$ KshB, *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155  $\Delta$ KshBAKstD с делециями в генах ферментов окисления стероидного ядра, а также *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D. На их основе были созданы рекомбинанты, ко-экспрессирующие гены 17 $\beta$ -ГСД гриба *Cochliobolus lunatus* и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г6ФДГ) *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Для этого химически синтезированные ДНК-последовательности 17 $\beta$ -ГСДCl и Г6ФДГMt в составе плазмиды pNS25 были перенесены в клетки хозяйских штаммов.

Схема одностадийного процесса биоконверсии 20 г/л Фс представляла собой комбинацию из двух этапов: окисления боковой цепи субстрата при нормальной аэрации культуры микроорганизма и восстановление промежуточных продуктов (АД, АДД) до Тс в микроаэрофильных условиях. В результате биотрансформации Фс рекомбинантными клетками *M. smegmatis*  $\Delta$ KshB (pNS25) и *M. smegmatis*  $\Delta$ KshBAKstD (pNS25) выход тестостерона составил не более 40 моль%. Наибольший выход Тс наблюдался при использовании рекомбинантных клеток *M. neoaurum* ВКМ Ас-1816D (pNS25), который превышал 60 моль% (7,2 г/л).

Созданные штаммы могут быть использованы в качестве платформы для эффективного одностадийного биотехнологического процесса получения Тс.

[1] Egorova et al. J. Mol. Catal. B: Enzym 2009, 57, 198–203.

[2] Bragin et al. J. Ster. Bioch. Mol. B. 2013, 138, 41–53.

## Дегградация образцов бактериальной целлюлозы культурой, содержащей бактерии рода *Cellvibrio* и *Cytophaga*

Кленова Н.А. \*, Маркова Ю.А., Ерофеева А.Е., Панкратов Т.А., Овчинникова Т.А.

Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева

Самара, \*klenova.ssu@yandex.ru

Бактериальная целлюлоза (БЦ) – экзополисахарид, продуцируемый ацетобактериями, обладает рядом уникальных свойств: чистотой, наноразмерами волокон, антиаллергенностью, высокой гигроскопичностью, хорошими механическими параметрами. Она и композиты на ее основе получают все большее распространение и применение в медицине и промышленности. Таким образом, актуальность приобретает проблема природной дегградации данного полимера и композитов из БЦ.

Целью исследования стало изучение скорости дегградации пленок и гелей БЦ, продуцируемых *Gluconacetobacter sucrofermentas* H-110 конгломератом целлюлозооксилюющих

бактерий. Бактериальная культура была выделена из почвенного образца, отобранного из горизонта ВС (глубина залегания 116-184см) почвенного профиля под смешанной дубравой на территории Красносамарского лесного массива Самарской области. Почвенные образцы до закладки опыта в течение 8 месяцев хранились при температуре +5°C. Выделение культуры было произведено путем посева почвенной суспензии на агар Чапека. Очистка культуры на агаре Чапека методом Дригальского обнаружила присутствие бактерий, относящихся к двум родам *Cellvibrio* (по 16S РНК) и *Cytophaga* (морфологические признаки).

Пленки и гели бактериальной целлюлозы получены культивированием *Gluconacetobacter sucrofermentas H-110* на среде HS (Ревин В.В., Лияськина Е.В., 2009) и среде с уксусной кислотой (Grande С.Ј., 2009) соответственно. Деградацию изучали, используя культивирование бинарной культуры на минеральной среде Чапека в чашках Петри при комнатной температуре. Образцы пленок бактериальной целлюлозы различной плотности и гели БЦ взвешивали, стерилизовали с помощью УФ-излучения и помещали в чашки с 20 мл среды. Затем чашки засеивали культурой целлюлозоразрушающих бактерий. Наблюдали, отмечая время полной деградации образцов.

Скорость деградации сухих тонких пленок БЦ желтоватого цвета бактериями р. *Cellvibrio* и р. *Cytophaga* достаточно высокая и составляет 0,750±0,015 мг/сутки, она сопоставима со скоростью деградации образцов фильтровальной бумаги, определенной нами в тех же условиях (0,774±0,018 мг/сутки), но меньше скорости утилизации кальки почти в 2 раза (1,400±0,023 мг/сутки). Более плотные пленки из БЦ белого цвета деградируют гораздо медленнее – скорость составила 0,300±0,017 мг/сутки).

Гели БЦ деградируют значительно быстрее (18,02±1,86 мг/сутки), вероятно, за счет аморфной структуры полимера и большей возможности бактериальной адсорбции, присутствия молекул воды между волокнами целлюлозы.

## **Биосинтез микофеноловой кислоты грибами рода *Penicillium***

*Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.*

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино, kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Микофеноловая кислота (МФК) синтезируется некоторыми видами грибов рода *Penicillium*. МФК и её производные – микофенолят натрия и микофенолят мофетила – являются основными субстанциями лекарственных препаратов, которые обладают иммунодепрессивным действием и используются в качестве профилактики острого отторжения трансплантата у больных с аллогенными трансплантатами почки. Эти препараты выпускаются крупнейшими мировыми фармацевтическими корпорациями. Микофеноловая кислота как лекарственное средство входит в перечень стратегически значимых лекарственных средств, производство которых должно быть обеспечено на территории Российской Федерации. В настоящее время разработкой отечественного препарата микофеноловой кислоты занимается ряд российских фармацевтических фирм.

Цель работы – изучение биосинтеза МФК грибами рода *Penicillium* и определение благоприятных условий для ее образования и выделения.

Объектами исследования служили штаммы *P. rugulosum* ВКМ F-4398, F-4402, F-4404 и *P. brevicompactum* F-4480, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН (ВКМ). Штаммы выращивали глубинно в средах СУА и в минеральной среде, содержащей маннит и янтарную кислоту, с добавками ионов цинка и дрожжевого экстракта. Было показано, что наиболее благоприятной для биосинтеза МФК штаммами является минеральная среда. Содержание МФК было в 1.1- 6.0 раз выше в зависимости от штамма по сравнению со средой СУА. Наиболее продуктивным оказался штамм F-4398, концентрация МФК в культуральной жидкости в конце культивирования (11 сут) составила 1.5 г/л.

Было исследовано влияние различных источников углерода на биосинтез МФК штаммом F-4398. Штамм выращивали в минеральной среде, содержащей глюкозу, сахарозу или маннит. Обнаружено, что на среде с маннитом концентрация МФК была выше в 6 и 3,6 раза по сравнению с глюкозой и сахарозой соответственно.

Было изучено влияние бензоата натрия (0.015%) и сорбата калия (0.02%) на биосинтез МФК штаммами F-4398 и F-4480. Показано, что у штамма F-4480 внесение бензоата натрия и

сорбата калия в минеральную среду привело к увеличению содержания МФК в 1.5 и 2.6 раза соответственно. Однако у штамма F-4398 добавление этих соединений снизило биосинтез МФК в 2-3 раза по сравнению с контролем. По-видимому, влияние бензоата натрия и сорбата калия на биосинтез МФК является штаммоспецифичным.

Проведено сравнение различных способов выделения МФК. В процессе работы был отобран метод, при котором выход МФК был выше в 1.4 раза по сравнению с другими.

Таким образом, был отобран штамм *P. brevicompactum* F-4398, обладающий высокой биосинтетической активностью. Установлены оптимальная среда для биосинтеза МФК штаммом и способ её выделения.

## **Роль *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016 в восстановлении микробного сообщества почвы в условиях гербицидной нагрузки**

*Колесникова М.В, Безлер Н.В.*

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара  
им. А.Л. Мазлумова, Воронеж, emarvlad@mail.ru

Технология возделывания сахарной свёклы включает 3-х-4-х кратное использование гербицидов, что вызывает стресс микробного сообщества почвы, особенно той его части, которая участвует в круговороте азота и синтезе гумуса.

Характер и скорость детоксикации гербицидов в почве определяется структурой микробоценоза, а эффективным приёмом ускорения этого процесса является внесение ряда органических субстратов.

В лаборатории эколого-микробиологических исследований почвы ФГБНУ «ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова» в 2012-2015 гг. были проведены исследования по внедрению аборигенного штамма *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016 в технологию возделывания сахарной свёклы при использовании гербицидов. Осенью под зяблевую вспашку вносили: солому озимой пшеницы, целлюлозолитический микромицет *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016, питательную добавку, в качестве которой использовали патоку (мелассу), и минеральный азот. Весной при появлении всходов сорной растительности провели двукратную обработку посевов гербицидами согласно методу расщепленных делянок.

Мониторинг изменений, происходящих в микробном сообществе чернозема выщелоченного, показал, что на фоне гербицидов значительно снизилась численность зимогенной микрофлоры в почве. Запашка соломы совместно с *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016, ПК и азотным удобрением привела к устранению негативного влияния гербицидов, повысив численность микроорганизмов принимающих участие в синтезе гумуса, в среднем на 23,5%.

Использование гербицидов вызвало также сокращение численности целлюлозолитических микроорганизмов и diaзотрофов в 1,5 раза. Совместное использование соломы, минерального азота и целлюлозолитического микромицета сняло негативное действие пестицидов, и численность этих групп микроорганизмов восстановилась.

Оказав негативное влияние на микробное сообщество почвы, обработка посевов гербицидами снизила урожайность сахарной свёклы в среднем за 4-и года на 6,0 т/га.

Таким образом, на основе ассоциативных взаимосвязей разного характера между группами почвенных микроорганизмов и растениями, внесение в почву целлюлозолитического микромицета *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016 способствовало восстановлению численности агрономически ценной микрофлоры, что позволило повысить урожайность сахарной свёклы на 8,9 т/га.

## Регио- и стереоселективная оксифункционализация стероидов андростанового ряда микромицетами

Коллеров В.В., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,  
Пушино, svkollerov@rambler.ru

Оксифункционализация, и в особенности, регио- и стереоселективное гидроксирование неактивных углеродных центров стероидных молекул является одной из наиболее сложных проблем органической химии, и это та область, где микробные биоконверсии с использованием мицелиальных грибов являются наиболее эффективными. Потребности современной медицины в  $11\alpha$ -,  $14\alpha$ -, а также  $7\alpha/\beta$ -гидроксированных производных андростанового ряда, широко используемых в качестве ключевых интермедиатов синтеза высокоэффективных противовоспалительных, антиаллергических, анаболических препаратов, а также ценных желчных кислот, с каждым годом возрастают. Между тем, при всем огромном разнообразии мицелиальных грибов, биокаталитический потенциал большей их части в отношении стероидов андростанового ряда остается практически не изученным.

Нами исследована активность 46 штаммов мицелиальных грибов из отделов *Ascomycota* и *Zygomycota* в отношении андрост-4-ен-3,17-диона (АД) и андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД). Шесть представителей родов *Acremonium*, *Sordaria*, *Conidiobolus*, *Fusarium*, *Mucor* и *Rhizomucor* не проявляли какой-либо активности, тогда как остальные 40 штаммов активно катализировали трансформацию АД и АДД. Среди продуктов биотрансформации были выделены и идентифицированы  $7\alpha/\beta$ ,  $11\alpha$ ,  $14\alpha$ -гидроксипроизводные, а также стероиды с восстановленной кетогруппой при С17 (тестостерон и дегидротестостерон). Два штамма *Aspergillus ochraceus* и *Beauveria bassiana* проявляли высокую  $11\alpha$ -гидроксилазную активность с селективным (>80%) накоплением соответствующих гидроксипроизводных. Среди представителей родов *Absidia*, *Acremonium*, *Bipolaris*, *Cunninghamella*, *Gibberella*, *Fusarium*, *Rhizopus* шесть штаммов проявляли способность к оксифункционализации стероидных субстратов при С14, 12 культур катализировали реакцию  $7\alpha$ -гидроксирования и 7 штаммов – введение гидроксильной группы в положение  $7\beta$  с образованием соответствующих гидроксипроизводных. Селективность реакции  $7\beta$ -гидроксирования с использованием наиболее перспективного аскомицетного штамма в подобранных оптимальных условиях превышала 50% с образованием  $7\beta$ -ОН-АДД в качестве основного продукта биоконверсии АДД.

Результаты расширяют представления о биокаталитическом потенциале мицелиальных грибов в отношении стероидов андростанового ряда и могут быть применены для получения востребованных гидроксистероидов.

## Культивирование микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104 в ферментационном комплексе для масштабирования получения активатора протеина С плазмы крови человека

Комаревцев С.К., Егорова М.А., Осмоловский А.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,  
skomarevtsev@yandex.ru

Штамм микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D является продуцентом активатора протеина С плазмы крови человека, который представляет собой негликозилированную сериновую протеазу с молекулярной массой около 33 кДа, рI 6,0 и оптимумом активности при рН 8,0 – 9,0 и температуре 37<sup>0</sup>С, имеет узкую субстратную специфичность, сходную с активатором из яда южноамериканского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*.

Штамм-продуцент является непатогенным и нетоксичным микроорганизмом, не вызывает аллергических реакций при нанесении на кожу кроликов и интоксикаций при внутривенном введении. Это позволяет рассматривать активатор протеина С из *A. ochraceus* ВКМ F-4104D как перспективный биотехнологический заменитель активаторов из яда змей, широко

используемых в настоящее время в диагностике и медицине. Для масштабирования получения активатора протеина С из *A. ochraceus* ВКМ F-4104D было проведено культивирование микромицета в ферментационном комплексе в ранее установленных оптимальных условиях для роста. Уже после 1 суток выращивания в ферментационном комплексе активаторная активность превышает значения, получаемые после 3 суток культивирования в качалочных колбах. При увеличении объёма питательной среды в ферментационном комплексе активаторная активность после культивирования не уменьшается, что свидетельствует о хорошей способности штамма микромицета к масштабированию и позволяет ставить дальнейшие эксперименты по ферментации в больших объёмах питательной среды.

Более продолжительное, чем 1 сутки, культивирование микромицета в ферментационном комплексе не привело к увеличению активаторной активности в культуральной жидкости. При этом наблюдали очень интенсивный рост микромицета, приводивший к значительному увеличению вязкости ферментационной среды и затруднял отделение биомассы от культуральной жидкости. Из этого следует, что для получения активатора протеина С оптимальное время культивирования микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в ферментационном комплексе составило 1 сутки.

## Роль ризосферных бактерий в детоксикации комплексных загрязнений

Крючкова Е.В., Бурыгин Г.Л., Нешко А.А., Гринёв В.С., Щёголев С.Ю., Турковская О.В.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,  
Саратов, kryu-lena@yandex.ru

Глифосат (Гл) – вещество, являющееся основой фосфорорганических гербицидных препаратов. Молекула Гл включает в себя три координационных центра: аминогруппу, фосфоновую и карбоксильную группы, формирующие связи с катионами металлов, образуя бидентантные или тридентантные комплексы. Данные о токсичности и биодоступности таких поллютантов по отношению к биологическим объектам практически отсутствуют. Можно предположить, что бактерии отдельно, либо в составе растительно-бактериальных ассоциаций способны к биотрансформации, биодеградации, биосорбции или биоаккумуляции подобных соединений.

В данной работе изучали токсическое действие комплексного загрязнения, представленного Гл и катионами меди (Гл- $\text{Cu}^{2+}$ ) по отношению к ризобактериям *Achromobacter ruhlandii* LCu2. Оценивали биосорбционный и аккумулирующий потенциал *A. ruhlandii* LCu2 в отношении Гл- $\text{Cu}^{2+}$ , а также протекторную роль микроорганизмов в составе растительно-бактериальных ассоциаций *in vitro* в условиях смешанного загрязнения.

Присутствие в среде культивирования 5 мМ Гл- $\text{Cu}^{2+}$  вызывало 60% ингибирование роста штамма LCu2. Добавление Гл- $\text{Cu}^{2+}$  в среды Эшби и Муромцева оказывало полное ингибирующее действие на процессы азотфиксации и соллюбилизации фосфатов.

Анализ биосорбционного потенциала показал, что инактивированная биомасса *A. ruhlandii* LCu2 обладала сорбционной ёмкостью по отношению к катионам  $\text{Cu}^{2+}$  - 25 мкг/мг биомассы при 25°C и pH 6. Однако комплексы Гл- $\text{Cu}^{2+}$  характеризовались высокой инертностью. Максимальное количество сорбированной меди в составе Гл- $\text{Cu}^{2+}$  составило 3 мкг/мг биомассы, что в 8 раз ниже по сравнению с несвязанным металлом. Внутриклеточного поглощения Гл- $\text{Cu}^{2+}$  растущими клетками также не было выявлено, что необходимо учитывать при изучении механизмов биодеградации сложных поллютантов.

Несмотря на выше сказанное, инокуляция штаммом LCu2 растений люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) приводила к существенному снижению токсического эффекта смеси поллютантов. Длина корня и побега проростков, выращенных на комплексном загрязнении, увеличивалась в  $2 \pm 0,4$  раза в присутствии штамма LCu2, а сырая биомасса на 45%, по сравнению с неинокулированными проростками. Соотношение хлорофиллов а/в достигало контрольного значения 2,5. Полученные данные важны для понимания и прогнозирования взаимодействий между объектами окружающей среды и смешанными загрязнениями.

## Использование *Rhodococcus wratislaviensis* 2AzMo для определения низших алифатических спиртов в водных растворах

Кувичкина Т.Н.<sup>1</sup>, Гридина В.В.<sup>2</sup>, Капаруллина Е.Н.<sup>1</sup>, Доронина Н.В.<sup>1</sup>, Решетилов А.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

<sup>2</sup>Тульский государственный университет, Тула, kuv@ibpm.pushchino.ru

Представители рода *Rhodococcus* обладают широкими метаболическими возможностями и осуществляют окисление природных и антропогенных углеводов. Однако, среди бактерий этого рода способность к метилотрофии ранее не была выявлена. Кроме того, поиск новых способов и технологий для определения низших алифатических спиртов на основе метилотрофных микроорганизмов может решить проблему определения содержания этих веществ в окружающей среде, и поэтому необходима разработка высокочувствительных, экспрессных и простых по конструкции аналитических устройств, таких как, например, биосенсоры. Целью работы являлась разработка биосенсора на основе нового факультативного метилотрофа *Rhodococcus wratislaviensis* 2AzMo, для определения метанола, этанола, изопропанола и изобутанола в водных растворах. Актинобактерии выделены из прибрежной зоны Азовского моря д.б.н. Дорониной Н.В. в лаборатории метилотрофии ИБФМ РАН. 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 (на метаноле 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 получали методом физической адсорбции на носителе (хроматографическая стеклобумага GF/A). Предел определения метанола составлял 3,9 мМ. Предел определения этанола составлял 6,1 мкМ. Предел определения изопропанола составлял 39 мкМ. Предел определения изобутанола составлял 9,8 мкМ. Анализ исследованных соединений проходил в течение 20 мин.

## Микроскопические грибы – продуценты внеклеточных протеиназ для биотехнологии и медицины

Кураков А.В., Осмоловский А.А., Бобровская А.А., Покровская Ю.С., Дунаевский Я.Е.

МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, kurakov57@mail.ru

Существует востребованность в щелочных протеазах и, протеазах с активностями белков системы гемостаза. Для отбора продуцентов этих ферментов изучали спектр экзопротеаз у новых видов и штаммов алкалофилов *Sodiomyces alkalinus*, *S. magadii*, *Chordomyces antarcticum*, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Verticillium zaregamsianum*, алкалотолеранта *Gibellulopsis nigrescens*, энтопатогиенов и нематофагов *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lilacinum*, *Paecilomyces carneus*, *Tolypocladium* sp., *T. cylindrosporium*, *T. inflatum* и сапротрофов *Aspergillus sclerotiorum*, *A. nidulans* и *A. ochraceus*. Протеолитическую активность определяли в культуральной жидкости по азоказеину, коллагенолитическую – по азоколу, фибринолитическую - по фибриногену, специфическую активность протеиназ – по синтетическим пептидным пара-нитроанилидным субстратам для эндопептидаз и экзопептидаз, субстратам Ха-фактора плазмы крови, плазмينا, тромбина, активированного протеина С, тканевого активатора пламиногена. Найдены штаммы с высокой фибринолитической активностью и активаторной к протеину С. Оптимизированы условия их культивирования, проведена первичная очистка ферментов и охарактеризованы их свойства. Показан не прямой механизм фибринолитического действия, обусловленный активаторной к плазминогену и АРС-подобной активностями у одного из штаммов. Высокие активности протеаз в условиях близких к крови позволяют предполагать их эффективное действие *in vivo*. Среди алкалофилов и алкалотолерантов выявлены штаммы, обладающие высокой общей протеолитической,

металлопротеазной, субтилизиноподобной, дипептидил-пептидазной и аминопептидазной активностями в щелочных условиях. Металлопротеиназы вносят основной вклад в активность протеаз у *C. antarcticum*. Обнаружена редкая для грибов активность цистеиновых протеиназ. Отобраны штаммы с высокой активностью протеаз при pH 6-10, повышенном содержании NaCl, Triton X-100, SDS и детергента Ariel, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и жидкого пятновыводителя Vanish Oxi Action, что показывает на возможность их практического применения.

## **Получение гибридов типа «клетка в оболочке» на основе инкапсулированных в золь-гель матрицу дрожжей**

*Лаврова Д.Г.\* , Каманина О.А., Пономарева О.Н.*

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула,  
\*d.g.fedoseeva@gmail.com

В процессе эволюции природных систем живые организмы развивают различные минерализованные структуры. Примерами таких структур являются силикатные оболочки диатомовых водорослей. Важнейшая функция таких систем — защита организмов и генетического материала своего вида от неблагоприятных условий. Это послужило примером для получения новых живых гибридных материалов путем искусственного объединения клеток с органосиликатными полимерами. Нами были получены такие «живые» материалы с использованием методов золь-гель химии, основанные на гидролизе алкоксисиланов с последующей конденсацией гидроксилсодержащих производных, что приводит к формированию фрактальных гелей, в которые иммобилизованы клетки. В работе использовали тетраэтоксисилан и метилтриэтоксисилан в объемном отношении 15/85 [1]. Для увеличения эластичности материала добавляли структуроуправляющий агент полиэтиленгликоль (ПЭГ). Было показано, что в зависимости от молекулярной массы структурообразующего агента ПЭГ изменялась и 3D-структура гибридных материалов. Наибольший интерес представляет архитектура гибридного биоматериала, полученного при использовании ПЭГ с молекулярной массой 3000 Да. Вокруг каждой клетки формируется капсула, при этом инкапсулированные клетки образуют единую структуру. Кремнийорганические капсулы защищают клетки от стрессовых факторов окружающей среды. Именно поэтому живые гибридные материалы, полученные нами, являются перспективными биокатализаторами при разработке биосенсоров для детекции метанола, биофильтров для очистки метанолсодержащих стоков [2].

*Работа выполнена при поддержке РФФИ №16-38-00700.*

## **Биотехнология микробных экзополисахаридов**

*Лияськина Е.В., Ревин В.В., Богатырева А.О., Сапунова Н.Б., Парамонова Е.Н., Щанкин М.В.*

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, liyaskina@yandex.ru

В последние десятилетия описано огромное количество микробных экзополисахаридов (ЭПС). Изучены их строение, структура, биосинтез и свойства. Значительный прогресс достигнут в обнаружении новых полисахаридов промышленного назначения. Широкое применение нашли такие бактериальные ЭПС, как ксантан, альгинат, леван, декстран, курдлан, гиалуроновая кислота, бактериальная целлюлоза и др. Они используются в медицине, фармацевтической, пищевой, химической и текстильной промышленности, в гидрометаллургии, технике, при добыче нефти и в ряде других областей. В пищевой промышленности бактериальные ЭПС используются в первую очередь как стабилизаторы и загустители различных продуктов. В фармацевтической промышленности они применяются для изготовления заменителей плазмы крови, различных лекарственных форм. Многие микробные ЭПС обладают лечебным и профилактическим действием: повышают устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, обладают противоопухолевой активностью, способствуют заживлению ран и регенерации тканей. Они имеют большой потенциал использования в медицине как биоматериал для тканевой инженерии, создания



раневых покрытий и трансдермальных терапевтических систем. Микробные ЭПС являются перспективным источником получения различных биокомпозиционных материалов.

На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского государственного университета в течение длительного времени проводятся исследования в области бактериальных ЭПС. Получены высокопродуктивные штаммы бактерий *Xanthomonas campestris*, образующие ксантан в количестве 26 – 28 г/л, *Leuconostoc mesenteroides*, образующие декстран в количестве 40-50 г/л, *Gluconacetobacter sucrofermentans*, образующие бактериальную целлюлозу в количестве 7 – 8 г/л. Подобраны оптимальные условия культивирования продуцентов, обеспечивающие максимальное накопление полисахаридов. Разработаны технологии производства ксантана, декстрана и бактериальной целлюлозы с использованием дешевых отходов промышленности. Получены новые материалы на основе бактериальной целлюлозы: аэрогели и биокомпозиты с антисептическими свойствами. Изучены их физико-химические и физико-механические свойства.

## **Микробные биопленки для продуктивного биокатализа и очистки окружающей среды**

*Максимова Ю.Г., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Демаков В.А.*

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН - филиал ФГБУН Пермского  
Федерального исследовательского центра, Пермь, maks@iegm.ru

ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь

В последние десятилетия в микробиологии сформировалось представление о биопленках как об основной форме существования бактерий. Преимущества прикрепленного состояния микробных клеток, а именно устойчивость к неблагоприятным факторам среды, долговременное сохранение ферментативной активности, отсутствие избыточного роста, сделали биопленки альтернативой традиционному способу осуществления биотехнологических процессов. Биопленки могут использоваться в промышленных ферментационных и биокаталитических процессах как саморегенерируемые системы, а метод биологической очистки сточных вод по своей сути является процессом, основанным на жизнедеятельности самоиммобилизующихся микроорганизмов. Использование предварительно выращенных на носителе бактерий, обладающих определенной биодеградативной активностью, позволит сделать процесс очистки сточных вод промышленных предприятий более эффективным при залповых выбросах поллютантов.

Цель работы – изучение биотехнологического потенциала биопленок нитрилутилизующих бактерий в процессах биокатализа и очистки воды от нитрилов и амидов карбоновых кислот.

Объектами исследования явились штаммы бактерий родов *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, обладающие нитрилгидратазной, амидазной и нитрилазной активностью. Изучен процесс биотрансформации нитрильных и амидных соединений моновидовыми биопленками нитрилгидролизующих бактерий. Показано, что клетки биопленок, выращенных на волокнистых углеродных и минеральных носителях, трансформируют акрилонитрил в акриламид, акриламид в акриловую кислоту за более короткий срок, чем суспендированные клетки. Проведен синтез концентрированного раствора акриламида из акрилонитрила биопленками на основе родококков, получен 40% раствор акриламида при 19-кратном внесении 1.6% акриламида. На основе смешанных биопленок родококков и алкалигенесов сконструирован биореактор, работающий в непрерывном режиме, отработаны условия его работы, и показано, что биокатализатор массой 7 г, занимающий объем 40.8 см<sup>3</sup>, при скорости пропускания очищаемой воды 6 мл/мин способен утилизировать 692 г/л ацетонитрила за 1750 ч непрерывной работы при дозированном внесении токсиканта.

Таким образом, в зависимости от характера конверсии нитрила (трансформация и накопление продукта, или полная минерализация) биопленки нитрилгидролизующих бактерий могут быть использованы либо для целей продуктивного биокатализа, как в случае трансформации акрилонитрила в акриламид штаммом *R. ruber* gt1, либо для очистки вод от нитрильных соединений, в том случае, когда биокатализатором служила бинарная биопленка на основе штаммов *R. ruber* gt1 и *A. faecalis* 2.

## **Антимикробные свойства штамма *Bacillus subtilis* 534– основы лекарственного препарата пробиотика СПОРОБАКТЕРИНА**

*И.А. Маланичева*<sup>1,2</sup>, *М.Х. Кубанова*<sup>2</sup>, *В.А. Алферова*<sup>1</sup>, *В.А. Коршун*<sup>1</sup>, *И.В. Дробркина*<sup>2</sup>, *Т.В. Крупенио*<sup>2</sup>, *О.В. Ефременкова*<sup>1</sup>, *Н.И. Габриэлян*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе», Москва, [instna@sovintel.ru](mailto:instna@sovintel.ru)

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» Минздрава России, Москва, [labgso@.ru](mailto:labgso@.ru)

Устойчивость условно-патогенной и патогенной флоры к широкому спектру антибактериальных препаратов ограничивает возможности быстро и надежно лечить бактериальные инфекции и выполнять широкий спектр современных медицинских операций, в частности, связанных с трансплантацией органов. Существует острая необходимость в разработке новых вариантов, схем и подходов ведения пациентов при угрозе развития некурабельных форм инфекций, связанных с госпитальными патогенами. В числе исследовательских направлений достаточно широко представлены работы, связанные с углублённым изучением антимикробной активности пробиотиков.

Многолетние исследования, проводимые в ФНЦТИО имени академика В.И.Шумакова в отношении отечественного пробиотического препарата СПОРОБАКТЕРИН (СП), показали клиническую эффективность его применения в технологии лекарственного ведения пациентов кардиохирургического и трансплантологического профиля. Химический анализ продуктов биосинтеза штамма 534 показал, что данный штамм образует не менее трех антибиотиков. Установлена активность культуральной жидкости штамма 534 и сырцов данных антибиотиков в отношении клинических изолятов патогенных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, в том числе из группы ESKAPE: против 20 из 24 штаммов *Acinetobacter baumannii*, в том числе против 15 панрезистентных изолятов, против 20 из 22 штаммов *Staphylococcus* sp., против 9 из 22 штаммов *Klebsiella pneumoniae* и против 34 из 36 патогенных грибов, в том числе 6 панрезистентных. В отношении ряда штаммов активность нативной культуральной жидкости превосходила таковую каждой из фракций, что указывает на необходимость доработки метода выделения активных компонентов. Биосинтез антибиотиков штаммом 534 можно рассматривать как важный фактор, обуславливающий лечебное действие СПОРОБАКТЕРИНА.

## **Конвективный перенос углеводородокисляющих микроорганизмов-деструкторов в почве, загрязненной нефтепродуктами**

*Марченко А.И., Жариков Г.А.*

Научно–исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов - филиал ФГБУ Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства России; Серпуховский район, пос. Большевик, [ai\\_marchenko@mail.ru](mailto:ai_marchenko@mail.ru)

В настоящее время для очистки почвы от загрязнения нефтью и нефтепродуктами широко используются микробиологические технологии (биоремедиация), основанные на внесении в загрязненную почву микроорганизмов-деструкторов. Пространственное распределение микроорганизмов-деструкторов по профилю почвы определяет степень ее колонизации и эффективность биоремедиации. При этом основным механизмом перемещения микроорганизмов в почве является конвекция, то есть движение со стоком влаги.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении конвективного переноса углеводородокисляющих штаммов в дерново-подзолистой почве и его влияние на биоремедиацию почвы.

Исследования проводили в лабораторных (почвенные колонки) и полевых экспериментах на песчаной, супесчаной и суглинистой дерново-подзолистых почвах с использованием углеводородокисляющих штаммов *Pseudomonas putida* 2A, *Rhodococcus* sp. 382, *Rhodococcus* sp. 6/1T, выделенных из почвы, грунтовых вод, загрязненных нефтью и продуктами ее переработки.

Численность и штаммовую принадлежность бактерий в образцах почвы определяли методом иммунофлуоресцентного анализа, а также путем анализа спектров устойчивости штаммов к антибиотикам.

Результаты исследований показали, что в загрязненных дизельным топливом и моторным маслом почвах легкого гранулометрического состава (песчаного и супесчаного) вымывание бактерий-деструкторов происходит более интенсивно, чем в суглинистой почве. Миграция бактерий-деструкторов в супесчаной и песчаной почвах превышала таковую в суглинистой в 2,2 и 3,6 раза соответственно.

Установлено влияние степени гидрофобности клеток на их миграцию в пористой среде. Оценка показателя гидрофобности микробных культур проводили по методике Розенберга. Показатель гидрофобности у культуры *Rhodococcus* sp. 6/1T был равен 60-72%, у штамма *Rhodococcus* sp. 382 – 42%, у *Pseudomonas putida* 2A – 26%. Перенос бактериальных клеток по вертикальному профилю загрязненных нефтепродуктами почв, а также эффективность биоремедиации осуществлялись более интенсивно при использовании штаммов-деструкторов с повышенной степенью гидрофобности бактериальных клеток.

## **Повышение устойчивости дрожжей, различных экологических групп, к ультрафиолету с помощью сорбции гуминовых веществ на поверхности клеток**

*Мингтеева Д. Г., Тихонов В.В.*

МГУ имени М.В.Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, vvt1985@gmail.com,  
mingteeva96\_danara@list.ru

Способность дрожжей синтезировать различные гормоны и ингибирующие вещества, давно используется в сельском хозяйстве (Amprayn et al., 2012; Agamy et al., 2013). Так биопрепараты на основе *Rhodosporidium paludigenum* используются против плесневого гриба *Penicillium expansum*, который вызывает порчу яблок и груш (Zhu et al., 2015), дрожжи *Pichia membranifaciens* активно используются против серой гнили (Masih et al., 2001). В связи с возрастанием биологизации сельского хозяйства, разработка биопрепаратов на основе микроорганизмов и стабильность последних в окружающей среде особо актуальны. Эффективность многих биопестицидов низка, из-за нестойкости действующих веществ, представленных микроорганизмами (Boyetchko et al., 1998). Ультрафиолет является важным фактором, определяющим быструю гибель активных агентов биопестицидов в окружающей среде (Killick, 1990, Koul, 2011). Гуминовые кислоты (ГК) близки по химическим свойствам к меланинам темноокрашенных грибов (Zavgorodnyaya et al., 2002), поэтому в перспективе, их можно использовать для защиты клеток от ультрафиолета.

Целью нашего исследования являлось изучения протекторных свойств биопленок ГК, нанесенных на клетки дрожжей, к ультрафиолету. В работе использовались дрожжи коллекции кафедры биологии почв МГУ, выделенные из различных местообитаний: *Solicoccozyma terreus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodosporidium paludigenum*, *Pichia membranifaciens*, *Candida albicans*. Облучение дрожжевых организмов проводили ультрафиолетом при 254 нм (Vilber Lourmat, 8 W, Франция) в течение 10 минут. Выживаемость после экспозиции УФ определяли методом посева на твердую питательную среду ГПД. Методом прямой микроскопии определяли морфологические изменения клеток. Адсорбцию ГК на поверхность клеток дрожжей проводили стандартным методом (Тихонов и др, 2013).

В нашей работе впервые показана защитная функция ГК, сорбированных на поверхности клеток дрожжей, к ультрафиолету. Виды дрожжей, адсорбирующие большее количество ГК, были менее подвержены УФ-излучению, чем виды, которые сорбировали меньше ГК. На наш взгляд, данный феномен может быть использован при разработке формуляций биопестицидов и других биопрепаратов, применяемых в хозяйственной деятельности человека.

*Авторы выражают благодарность научным сотрудникам МГУ Максимовой И.А. и Качалкину А.В. за предоставление штаммов дрожжей и научное консультирование.*

## **Микробные процессы - анаммокс и метаногенез, в новых технологиях очистки сточных вод и переработки ТБО**

*Ножневникова А.Н., Литти Ю.А., Бочкова Е.А., Ковалев Д.А., Никитина А.А., Зубов М.Г.*

Федеральный исследовательский центр фундаментальных основ биотехнологии РАН Институт микробиологии им С.Н. Виноградского, Москва, nozhevni@mail.ru

Важнейшими экологическими проблемами современных городов являются качественная очистка сточных вод с удалением азота и фосфора, и эффективная переработка ТБО. Выделение и исследование содержащей анаммокс-бактерии накопительной культуры помогло созданию совместно с «Компанией ЭКОС» новой технологии и компактных станций очистки сточных вод «БХ-ЭКОС». Особенности схемы очистки являются: (1) предварительная обработка поступающей воды флокулянтами, способствующая удалению 50% фосфора; (2) использование на всех этапах биологической очистки иммобилизирующей микроорганизмы ершовой загрузки; (3) инокуляция денитрификатора обогащенными анаммокс-бактериями активным илом; (4) рецикл очищаемой воды из аэротенка в денитрификатор, где анаммокс-бактерии повышают удаление азота ( $N_2$ ) на 30%; (5) биологическая доочистка воды при пониженной аэрации; (6) физико-химическая доочистка. Технология получила развитие в создании крупных станций «Мегаполис». Новые станции являются первыми в мире полномасштабными очистными сооружениями с использованием процесса анаммокс при очистке основного потока хозяйственно-бытовых и городских сточных вод.

Захоронение мусора на полигонах ТБО является единственным способом его утилизации в России. Считанные мусоросжигательные заводы не решают проблему, поскольку выбросы газов, образующихся при сжигании недостаточно хорошо сортированного мусора, являются крайне токсичными. Одной из возможностей переработки отсортированной органической фракции ТБО является ее микробное сбраживание в метантенках с получением метана. Наши исследования показали, что целесообразно совместное сбраживание ОФ-ТБО и осадков сточных вод в метантенках, имеющих на городских очистных сооружениях. При этом выход метана увеличивается в 2-3 раза вследствие повышения концентрации органических веществ в обрабатываемой массе. Нами показано, что в случае «закисления» добавление флокулянта в сбраживаемую массу, вызывает образование гранул и способствует восстановлению процесса образования метана.

## **Хромогенная питательная среда Даг Урохром Агар для одноэтапного выделения и идентификации, клинически значимых условно-патогенных микроорганизмов (УПМ)**

*Омарова С.М., Горелова В.Г., Юнусова Р.Ю., Ахмедова Р.С.*

ФГБОУ ВО Дагестанский государственный медицинский университет МЗ РФ, РД, Махачкала, dgma@list.ru

В настоящее время продолжает оставаться актуальной проблема выявления и идентификации УПМ, в т.ч. условно-патогенных энтеробактерий (УПЭ) при инфекционных процессах различной локализации, при этом по литературным данным более 50% инфекций, вызванных условно патогенными энтеробактериями, остаются этиологически нерасшифрованными и диагностируются как «кишечная инфекция неясной этиологии». Трудность в расшифровке таких инфекций объясняется сходством их биохимических реакций и симптоматики клинической картины заболеваний, вызванных УПЭ.

Современные методы лабораторной диагностики УПЭ представляют собой многоэтапный процесс, требующий значительного времени на исследования в связи с многообразием схожих биохимических реакций и яркой выраженностью родственных связей представителей УПЭ. За рубежом со второй половины прошлого века эта задача решена с помощью хромогенных

питательных сред, позволяющих на основе выявления высоко специфических ферментов бактерий осуществить идентификацию возбудителя одновременно с его выделением, то есть в один этап.

В процессе исследований были определены оптимальные сочетания белковых основ и стимуляторов микробного роста, обеспечившие высокую чувствительность среды – рост тест-штаммов при минимальной посевной дозе – из разведения  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  микробной суспензии, что не уступало импортному аналогу. При посеве смеси тест-штаммов из разведения  $10^{-6}$  колонии *E.coli* вырастают размером  $2,0 \pm 0,2$  мм и окрашиваются в сине-зеленый цвет, т.к. продуцируют оба фермента  $\beta$ -глюкуронидазу и  $\beta$ -галактозидазу, которые расщепляют оба хромогенных субстрата –  $\beta$ -D глюкуронид и  $\beta$ -D галактопиранозид с выделением в среду хромофоров соответственно синего и желтого цвета. Колонии *Enterobacter cloacae* и *Citrobacter freundii* вырастают размером  $2,0 \pm 0,2$  мм и окрашиваются в желтый цвет, т.к. продуцируют только фермент  $\beta$ -галактозидазу, расщепляющую хромогенный субстрат –  $\beta$ -D галактопиранозид с выделением в среду хромофора желтого цвета. *Klebsiella* spp. вырастают крупными слизистыми колониями размером  $2,0 \pm 0,2$  мм и окрашиваются в красно-оранжевый цвет с желтым ореолом вокруг колоний, т.к. одновременно расщепляют салицин и продуцируют фермент  $\beta$ -галактозидазу. Колонии *Proteus* spp. вырастают размером  $2,5 \pm 0,5$  мм в O-форме и окрашиваются в коричневый цвет с коричневым преципитатом в среде вокруг колоний, в связи с расщеплением триптофана родоспецифическим ферментом протеев триптофандезаминазой с образованием продуктов расщепления триптофана коричневого цвета. *Enterococcus faecalis* вырастает мелкими колониями размером  $0,8 \pm 0,2$  мм и окрашиваются в красный цвет в связи с расщеплением салицина с образованием кислых продуктов, понижающих pH среды и, соответственно, изменяющих окраску индикатора нейтрального красного от бесцветного до красного. *Staphylococcus aureus* вырастает размером  $1,8 \pm 0,2$  мм, в виде бесцветных колоний, т.к. не расщепляет салицин и триптофан и не продуцирует вышеназванных специфических ферментов УПЭ. Колонии *Pseudomonas aeruginosa* вырастают размером  $1,5 \pm 0,2$  мм с серо-зеленым пигментом.

## **Алкалофильные микроорганизмы для биологической очистки щелочных радиоактивных растворов**

*Осталкевич С.С., Колокольцев А., Сафонов А.В., Хижняк Т.В.*

ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, khijniaktv@yandex.ru

Отходы низкого уровня активности являются одной из самых больших по объему категорий. Высокое содержание нитратов (до сотен г/л) и наличие металлов в переменных степенях окисления (уран, технеций) является одной из проблем при хранении в цементном компаунде - высокое содержание нитратов не позволяет провести достаточное концентрирование отходов, а наличие переменновалентных радионуклидов приводит к высокой степени выщелачивания элементов из цемента.

Одним из методов подготовки щелочных высокосоленых радиоактивных отходов к цементированию может быть их микробиологическая обработка, позволяющая за счёт удаления нитрата значительно понизить солесодержание и уменьшить объём. Удаление металлов в восстановленных формах позволит снизить активность матрицы и уменьшить вероятность их вымывания и распространения после захоронения.

Цель данной работы - поиск подходящих устойчивых чистых и накопительных культур микроорганизмов из щелочных местообитаний для использования в лабораторных экспериментах по очистке комплексных щелочных радиоактивных отходов.

На примере культур выделенных из щелочных озер исследовано восстановление и удаление хромата, пертехнетата, уранил-ионов и нитрата в щелочных средах как чистой (*Halomonas* sp.), так и накопительными культурами (выделенными с уранил-нитратом). В модельных условиях при одновременном наличии двух анионов (нитрат-хромат, нитрат-пертехнетат, нитрат-уранил-ион) первым восстанавливается нитрат-ион. Восстановление хромата, пертехнетата и уранила чистой культурой денитрифицирующей бактерий снижается, в отличие от накопительных культур, где эффективность удаления остается прежней. Через 14-20

суток культивирования в системе нитрат-хромат удалено 52 и 84% хромата чистой и накопительной культурой, нитрат-пертехнетат – 48 и 22%, нитрат-уранил – 55 и 20%, соответственно.

В полученных накопительных культурах установлены доминирующие виды бактерий – в системе с уранил-нитратом доминируют галоалкалофильные бактерии (52,7%) и пурпурные серные бактерии (30,9%); в системе пертехнетат-нитрат – доминируют бактерии рода *Halomonas*.

Полученные результаты показывают перспективность биотехнологического представлять интерес не только с фундаментальной точки зрения, но и для разработки рекомендаций по созданию новой биотехнологии биоремедиации радиоактивных стоков предприятий ядерно-топливного цикла.

## **Анаэробные целлюлозолитические микробные сообщества, разлагающие биомассу *Anabaena variabilis***

*Петрова Е.В., Егорова М.А., Малахова Д.В., Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И*

Кафедра микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва,  
tsavkelova@mail.ru

Альтернативное топливо одинаково востребовано, как в промышленности, так и в децентрализованной системе энергообеспечения. При этом водные фототрофные микроорганизмы могут быть рассмотрены как перспективный источник для получения биотоплива: по продуктивности биомассы, например, микроводоросли значительно опережают многие "энергетические растения". Однако широкое их применение затруднено за счет трудноразлагаемой клеточной стенки, а также содержания целлюлозных и геми-целлюлозных компонентов в составе внеклеточных полисахаридов, образования токсичных для анаэробных микроорганизмов соединений, а также высокого содержания азота в биомассе, которое является причиной низкого соотношения C:N, в то время как оптимальным, например, для метаногенеза, являются значения 20:1 или 30:1. Нашей целью было изучить возможность использования селективированных на целлюлозосодержащих субстратах нескольких анаэробных микробных сообществ для биотрансформации в биогаз биомассы *Anabaena variabilis*.

Наибольшую эффективность конверсии биомассы фототрофов в термофильных условиях имели сообщества № 3 и 4, выделенные из жома винограда, и № 7, выделенное из навоза крупного рогатого скота (КРС). Выход биогаза более 55% был обнаружен при использовании сообществ № 21 и 22, выделенных также из навоза травоядных копытных (антилоп). Суммарное содержание метана в составе биогаза было достаточно высоким (55-64%), однако, при пересчете количества CH<sub>4</sub> на г биомассы значения продукции метана не превышали 5 ммоль CH<sub>4</sub>/г биомассы. Кроме того, при длительном культивировании и последующих пересевах с использованием биомассы *A. variabilis* в качестве единственного источника углерода и энергии, было отмечено постепенное сокращение образуемого биогаза вплоть до показателей содержания кумулятивного метана не превышавшего 25%.

DGGE анализ состава *Bacteria* исследованных термофильных сообществ, исходно культивируемых в течение нескольких пассажей на целлюлозе, показал, что во всех пробах разнообразие и интенсивность (яркость) полос отличались между исходным и конечным составом селективированных микробных сообществ, которые были затем использованы для биоконверсии биомассы цианобактерий. В процессе селекции изменился не только качественный (число регистрируемых полос), но и количественный состав. Разнообразие метаногенов, однако, оказалось сходным среди микробных сообществ, проявивших наибольшую активность при разложении биомассы *A. variabilis*, и содержало представителей *Methanoculleus*, *Methanogenium* и *Methanosarcina*. Учитывая то, что популяции метаногенов оказались сходными, можно предположить, что существенное влияние на эффективность утилизации и биоконверсии как целлюлозы, так и биомассы *A. variabilis*, может иметь разнообразие и количество синтрофных, в том числе ацетат-окисляющих бактерий, что, однако, требует дальнейшего изучения.

# Влияние некоторых углеродных наноматериалов на свойства анода микробного топливного элемента

*Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Решетилов А.Н.*

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

Процесс генерации электроэнергии в биотопливном элементе (БТЭ) зависит от множества взаимосвязанных факторов - взаимодействия биокатализатора с электродами, медиаторами, диффузии субстрата и продуктов его трансформации. В настоящий момент множество исследований в области БТЭ направлено на изучение свойств наноматериалов.

Целью данной работы являлось исследование и создание нового класса биотопливных элементов на основе микробных клеток, иммобилизованных на графитовые электроды, модифицированные проводящими наноматериалами (многостенные углеродные нанотрубки, терморасширенный и высокоориентированный пиролитический графиты, оксид графена, оксид графена восстановленный) и углеродным волокном. Изучали изменение под влиянием наноматериалов циклических вольтамперных характеристик, величины генерируемого потенциала, импеданса, сопротивления анода, а также мощности БТЭ в целом. Измерения выполняли по трех и/или двух электродным схемам. Использование многостенных углеродных нанотрубок приводило к увеличению мощности БТЭ на 26%; сопротивление переноса заряда при приложенных потенциалах нулевом и 200 мВ составляло, соответственно,  $\sim 2.1$  кОм $\cdot$ см<sup>2</sup> и  $\sim 2.3$  Ом см<sup>2</sup>, что на 30% и 47 % ниже, чем у немодифицированного электрода. Внутреннее сопротивление модифицированного анода было в 2 раза ниже контрольных значений и составляло  $\sim 1.6$  Ом см<sup>2</sup>. Модификация анода оксидом графена и восстановленным оксидом графена на 6 и 12% увеличивала мощность БТЭ и уменьшала его внутреннее сопротивление на 37% и 50%, соответственно. Внутреннее сопротивление БТЭ при модификации анода углеродными волокнами было на 15 % ниже контрольного внутреннего сопротивления БТЭ без модификации анода. Терморасширенный и пиролитический графиты практически не оказывали положительных эффектов.

Исследованные схемы модификации анода могут найти широкое применение в установках микроэнергетики для питания микромощных электронных устройств и создания автономных микроботов.

*Выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-29-01292 ОФИ\_М\_2015).*

## Создание прототипа технологии микробиологического синтеза такролимуса

*Пошехонцева В.Ю.<sup>1,2</sup>, Фокина В.В.<sup>2</sup>, Салионов Д.С.<sup>3</sup>, Шутов А.А.<sup>2</sup>, Донова М.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Пущинский государственный естественно-научный институт, г. Пущино

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва  
rikahameleon@mail.ru

Такролимус (FK-506) – 23-членный макроциклический поликетид, продуцируемый бактериями рода *Streptomyces*. 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.

Наиболее существенными недостатками современных технологий производства такролимуса являются, во-первых, низкий уровень биосинтетической активности и ее нестабильность у большинства известных штаммов-продуцентов, во-вторых, трудоемкость и дороговизна процесса очистки препарата до фармакопейной чистоты.

Целью настоящей работы являлась разработка эффективного метода микробиологического синтеза такролимуса.



В работе был использован штамм *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д, обеспечивающий титр такролимуса 500-600 мг/л.

Определены критерии селекции наиболее активных морфотипов штамма. Показано, что наиболее продуктивный морфотип (выход FK-506 в среднем выше на 10-18%), представлен интенсивно окрашенными кирпично-оранжевыми колониями округлой формы, 7-13 мм в диаметре, с выраженной структурной дифференциацией поверхности.

Отработаны условия поддержания высокой биосинтетической активности морфотипа. Нами выявлено, что эффективным способом поддержания штамма является хранение культуральной жидкости в равных долях с 50%-ым глицерином при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Оптимизацию условий культивирования штамма повели на основе зависимости целевой биосинтетической активности от состава питательных сред и параметров инкубирования. 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 FK-506 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 предотвращает деградацию такролимуса культурой-продуцентом.

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

Разработана финишная очистка такролимуса, позволяющая получать субстанцию фармакопейной чистоты с выходом более 50% (при нагрузочной способности не выше 1 г такролимуса /кг сорбента). Показано, что сульфокатиониты на основе силикагеля, модифицированные ионами серебра, обеспечивают отделение близкородственных аналогов. Подобраны условия для отделения аналогов от такролимуса в условиях сорбционной очистки.

Результаты могут быть использованы при создании технологии процесса биосинтеза такролимуса на пилотном и опытно-промышленном уровнях.

## **Нефтяные углеводороды-биомаркеры в продуктах термолиза нерастворимой части биомассы архей *Thermoplasma* sp.**

*Пошибаева А.Р.<sup>1</sup>, Гируц М.В.<sup>1</sup>, Перевалова А.А.<sup>2</sup>, Кошелев В.Н.<sup>1</sup>, Гордадзе Г.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Российский государственный университет нефти и газа (НИУ) им. И.М. Губкина, Москва

<sup>2</sup>Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН (ИНМИ РАН), Москва  
gordadze@rambler.ru

Настоящая работа является продолжением серии работ по образованию нефтяных углеводородов(УВ)-биомаркеров из биомассы прокариотических организмов. Нами было показано, что из биомассы бактерий *Arthrobacter* sp. и *Pseudomonas aeruginosa* образуются нефтяные УВ-биомаркеры – н-алканы, изопренаны, стераны и терпаны.

Объектом исследования представленной работы являются термофильные археи *Thermoplasma* sp. штамм Kam2015<sup>T</sup>, который был выделен из Нефтяной площадки кальдеры Узон (Камчатка, Россия). Экстракцию растворимой части биомассы архей проводили н-гексаном в ультразвуковой ванне. Нерастворимую часть биомассы архей подвергали термолизу при  $330^{\circ}\text{C}$  с последующим изучением распределения насыщенных УВ на молекулярном уровне. Анализ УВ проводили методами капиллярной газожидкостной хроматографии и хроматомасс-спектрометрии.

Как показали наши исследования, в результате термолиза образуются как алифатические, так и циклические нефтяные УВ-биомаркеры. Среди алканов образуются н-алканы  $\text{C}_{12}-\text{C}_{41}$  и изопренаны  $\text{C}_{14}-\text{C}_{20}$ . Причем наблюдается превалирование н-алканов с нечетными атомами углерода в молекуле  $\text{C}_{25}$ ,  $\text{C}_{27}$ ,  $\text{C}_{29}$  и  $\text{C}_{31}$  над четными  $\text{C}_{26}$ ,  $\text{C}_{28}$ ,  $\text{C}_{30}$ ,  $\text{C}_{32}$ . Величина отношения генетического показателя пристан/фитан равна 0,84 (напоминает нефти, генерированные морским органическим веществом (ОВ)), а величины отношения пристан/н- $\text{C}_{17}$  и фитан/н- $\text{C}_{18}$  близки к единице и составляют соответственно 0,87 и 0,84 (свидетельствует о слабой степени зрелости ОВ). Кроме того, среди разветвленных алканов наблюдается образование значительных количеств 10-метилгенэйкозана, 11-метилдокозана и 12-метилтрикозана. Среди циклических углеводородов образуются нефтяные стераны  $\text{C}_{27}-\text{C}_{29}$ , распределение которых



напоминает нефти, генерированные морским ОВ. Величина отношения диа/регулярных стеранов составляет 0,11 (свидетельствует о генерации ОВ в карбонатных толщах), а коэффициенты зрелости  $K_1$  - 0,33 и  $K_2$  - 0,53 (характерно для слабой степени зрелости ОВ).

Необходимо отметить, что нами был проведен и пиролиз Rock-Eval. По данным пиролиза максимальная температура  $T_{max}$  составляет 412°C (что соответствует низкой степени зрелости ОВ),  $HN=454$  (морское ОВ). Таким образом, данные пиролиза Rock-Eval также свидетельствуют об очень слабой степени зрелости ОВ морского генезиса.

*Работа выполнена при финансовой поддержке со стороны Минобрнауки России в рамках выполнения базовой части государственного задания, проект № 4.5438.2017/БЧ.*

## **Биоконверсия целлюлозосодержащих субстратов в биотопливо**

*Прокудина Л.И., Егорова М.А., Малахова Д.В., Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И*

Кафедра микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва,  
tsavkelova@mail.ru

Одним из направлений современной биотехнологии является использование микроорганизмов и их сообществ для получения биотоплива в результате микробиологической конверсии биомассы растений, продукции и отходов лесопользования и лесопереработки, сельского хозяйства и животноводства, различных видов органических бытовых и промышленных отходов. В случае использования растительных субстратов, содержащих лигнин, необходимы этапы предобработки, так как наличие трудно разлагаемого лигнина значительно затрудняет весь процесс биотрансформации этих субстратов.

Для изучения влияния предобработки субстратов с помощью микромицетов при разложении бумажной продукции максимальные значения целлюлозолитической активности в культуральной жидкости гриба *Trichoderma viride* были получены на 3-7 сут культивирования, например, на офисной бумаге - 0.8 Ед./мл (10.2 Ед./мг белка) и смеси бумаг - 0.73 Ед./мл (2.9 Ед./мг белка). Хотя внесение в среду для выращивания *T. viride* сахарозы стимулировало образование  $\beta$ -1,4-эндоглюканазы, по общей целлюлозолитической активности наиболее эффективным оказалось культивирование *T. viride* на среде без дополнительного внесения сахарозы: его активность превышала таковую у другого микромицета (*Aspergillus terreus*) в 2.6 раз на офисной бумаге, в 3.1 раза на журнальной, в 2.7 раз на фильтровальной, в 1.7 раз на газетной и в 2.3 раза на смеси бумаг. Последующее культивирование на лигнинсодержащей смеси бумаг термофильного (+55°C) анаэробного микробного сообщества, выделенного из навоза крупного рогатого скота (КРС), повышало эффективность гидролиза субстрата только после предварительной предобработки микромицетом *T. viride* в течение 3 суток с образованием 52,3% метана (64,7 ммоль метана/л среды). Предобработка *T. viride* также улучшила гидролиз фитомассы (измельчённые стебли и листья) топинамбура с помощью метаногенного микробного сообщества ("Σ4"), что в 1.5 раза увеличило выход биогаза (49% метана в составе биогаза). В то же время сообщество навоза КРС было более эффективно на этом субстрате без предобработки грибом (56,3% метана).

Метагеномный анализ состава микробного сообщества (Σ 4), культивируемого на офисной бумаге, показал, что доминирующими группами домена *Bacteria* были *Acetivibrio*, *Herbinix*, *Thermoanaerobacterium* и *Tepidanaerobacter*. Среди доминирующих групп архей были *Methanothermobacter* и *Methanosarcina*. HTS (high-throughput sequencing) анализ подтвердил преимущественное развитие гидролитиков - представителей класса *Clostridia* (*Firmicutes*). Наличие и разнообразие синтрофных ацетат-окисляющих бактерий (*Thermoanaerobacterium* и *Tepidanaerobacter*) и их тесное взаимодействие с гидрогенотрофными метаногенами необходимо для успешной конверсии в биогаз целлюлозосодержащих субстратов в термофильных условиях культивирования микробного сообщества.

# Сравнительный анализ влияния синтетических и биологических поверхностно-активных веществ на биодegradацию н-гексадекана бактериями рода *Rhodococcus*

Пучкова М. Ю., Лыонг Т. М., Петриков К. В.

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, mariya.puchkova@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино

В связи с интенсивным развитием добычи и транспортировки нефти в регионах с холодным климатом, таких как арктические территории, актуальным является разработка биотехнологий очистки нефтезагрязненных сайтов в условиях низких температур окружающей среды. При пониженных температурах многие компоненты нефти переходят в твердое состояние, что снижает их биодоступность. Одним из подходов для увеличения доступности гидрофобных субстратов является применение поверхностно-активных веществ (ПАВ) совместно с микробными биопрепаратами. Однако практически не исследовано влияние ПАВ на биодegradацию углеводов нефти при низких температурах.

Для сравнительного изучения влияния ПАВ на degradation н-гексадекана при 26°C и 10°C бактериями-нефтедеструкторами *Rhodococcus* sp. X5 и *Rhodococcus* sp. S67, входящими в биопрепарат «МикроБак», в питательную среду вносили биосурфактант – сукцинилтрегалопид или синтетический анионный ПАВ - додецилсульфат натрия (ДСН), в концентрациях 50, 100 и 200 мг/л. При 26°C с увеличением концентрации добавляемого биосурфактанта наблюдали заметное повышение степени degradation гексадекана (с 12% до 45%) только у штамма X5, что обусловлено ростом бактерий во всем объеме культуральной среды, в отличие от бактерий штамма S67. При внесении анионного ДСН (100 мг/л и выше) происходило ингибирование роста микроорганизмов. Это может быть обусловлено образованием отрицательно заряженных ассоциатов ДСН-гексадекана, которые не взаимодействуют с гидрофобными клеточными поверхностями родококков-нефтедеструкторов.

При пониженной температуре культивирования добавление как биосурфактанта, так и ДСН, не оказало воздействие на степень degradation гексадекана обоими штаммами. Максимальное значение степени degradation для штаммов X5 и S67 при этой температуре составило 23% и 30% соответственно. Это можно объяснить разными механизмами поступления жидких и твердых гидрофобных субстратов в клетки бактерий. При 26°C важную роль играет псевдорастворение гексадекана при участии ПАВ, а при 10°C преобладает механизм прямого контакта клеток бактерий с твердым гидрофобным субстратом. Полученные данные следует учитывать при разработке биотехнологий ремедиации нефтезагрязненных территорий.

## Гидролитические ферменты экстремофильных микроорганизмов, выделенных из водных систем Байкальской рифтовой зоны

<sup>1</sup>Раднагуруева А.А., <sup>1</sup>Будагаева В.Г., <sup>1</sup>Зайцева С.В., <sup>1</sup>Бархуртова Д.Д., <sup>1,2</sup>Лаврентьева Е.В.

<sup>1</sup>Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

<sup>2</sup>Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, arguuna\_rg@mail.ru

В термальных источниках Байкальской рифтовой зоны проведен биохимический анализ в природных пробах микробных матов и донных осадков. Было показано, что высокие значения субтилизин-подобной активности проявляются в основном в микробных матах, в то время как максимальные величины трипсин-подобной активности обнаруживались как в матах, так и в донных осадках. Авторами были выделены чистые культуры из термальных источников Алла и Гарга. Анализ гена 16S рРНК выделенных бактерий показал, что культуры являются представителями рода *Meiothermus* и *Thermus*. Стандартным методом Эрлангера (Erlanger et al., 1961), используя 5 мМ пара-нитроанилидные субстраты, изучена динамика накопления внеклеточной протеолитической активности в процессе роста культур в зависимости от источника азота. Штаммы обладали наибольшей активностью в отношении субстратов, специфичных для субтилизин-подобных (GlpAALpNa) пептидаз и аминопептидаз (L-pNa, P-

pNa). Пептидазы штаммов имеют оптимум активности при pH 8 - 9 и стабильны в широком диапазоне от 4,78 до 10,38. Температурный оптимум штаммов равен 50°C. Проведенный анализ природы функциональных групп активного центра показал, что культуры секретируют преимущественно пептидазы, относящиеся к классу сериновых пептидаз субтилизин-подобного типа.

*Работа поддержана грантами РФФИ №15-04-01275, №15-44-04335, №16-48-030881, МО РФ №6.9754.2017/БЧ.*

## **Микробный биотопливный элемент и конвертерное накопление электрической энергии**

<sup>1,2</sup>Решетилов А.Н., <sup>1</sup>Решетилова Т.А., <sup>2</sup>Василов Р.Г.

<sup>1</sup>ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино

<sup>2</sup>Отдел биотехнологии и биоэнергетики, Курчатовский комплекс НБИКС-технологий, НИЦ "Курчатовский институт" anatol@ibpm.pushchino.ru

Работы, направленные на получение микробных биосенсоров и микробных биотопливных элементов (МБТЭ), основаны на разработках лаборатории, связанных с созданием серии биосенсорных анализаторов для использования в пищевой промышленности и охране окружающей среды [1]. МБТЭ представляют большой научный и практический интерес, т.к. они могут использоваться для различных целей, в т.ч. для электрического питания устройств низкой мощности. Такие источники могут найти использование не только как источники питания для плееров, мобильных телефонов, планшетных компьютеров, но, главным образом, для использования в качестве источников электроэнергии для микроустройств типа водителей сердечного ритма, микронасосов и тому подобного оборудования.

Нами впервые в макете МБТЭ в качестве биоматериала использованы мембранные фракции бактерий рода *Glucanobacter*, представляющие конгломераты RQQ-зависимых дегидрогеназ и обладающие их каталитическими свойствами. Мембранные фракции иммобилизованы на электроды (8×5×0,5 мм<sup>3</sup>), полученные из графеноподобного наноматериала (терморасширенного графита), что позволило получить МБТЭ с удвоенной удельной мощностью (~ 10 мкВт/см<sup>2</sup>) по сравнению с контрольной.

Дальнейшие работы были направлены на оценку возможности улучшения параметров: впервые для МБТЭ создан макет по накоплению энергии с помощью конвертера постоянного напряжения. Исходное значение 0,5 В поднимали до результирующего напряжения 3,1 В, которое сохраняли на конденсаторе емкостью 6800 мкФ. МБТЭ использовали как первичный источник в системе сбора электрической энергии на основе конвертера BQ25504 (Texas Instruments), который осуществляет трансформацию энергии, получая ее от микроваттных первичных источников. Конвертер при стартовом напряжении на первичном источнике 0,33 В (обязательное условие) переходит в режим накопления энергии, для которого затем требуется поддерживающее входное рабочее напряжение 0,1 В. Разработанная система сбора на основе конвертера позволила поднять начальное напряжение МБТЭ в 6 раз (от 0,5 до 3,1 В); накопленную энергию сохраняли на конденсаторах различной емкости. Данный подход рассматривается как начальная стадия исследования вопроса о практическом использовании пары "МБТЭ-конвертер".

Созданные макеты определяют возможный путь миниатюризации МБТЭ и его практического использования – так, впервые в мировой практике проведена имплантация МБТЭ в организм лягушки *Rana temporaria*. Напряжение на выходных клеммах топливного элемента (~50 мВ) и время его наработки (7-12 мин) находились в пределах, достаточных для практического использования в гибридных системах и соответствовали таковым, описанным в литературе по имплантации БТЭ в другие организмы (улитки, лобстеры).

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 15-29-01292 ОФИ М 2015).*

[1] Решетилов А.Н. Биосенсоры и биотопливные элементы: исследования, ориентированные на практическое применение (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 268-274.

## **Биогеохимические проницаемые барьеры для очистки водоносных горизонтов от компонентов радиоактивных отходов**

*Сафонов А.В.<sup>1</sup>, Андрющенко Н.Д.<sup>1</sup>, Бабич Т.Л.<sup>2</sup>, Захарова Е.В.<sup>1</sup>, Назина Т.Н.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, 119071, г. Москва

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
Москва, alexeysafonof@gmail.com

Загрязнение подземных водоносных горизонтов вследствие нерационального природопользования, техногенных аварий, работы предприятий горно-добывающей и перерабатывающей промышленности, сельского хозяйства приводит к неконтролируемой миграции высокотоксичных соединений в системе подземных вод и создает риски их попадания в водозаборы бытового и хозяйственного назначения.

Особо опасным является загрязнение радиоактивными элементами с длительным периодом полураспада, остающимися высокотоксичными на протяжении многих тысяч лет. При этом только часть радионуклидов иммобилизуется при контакте с породами водоносного горизонта, а элементы с переменной валентностью в окисленной форме обладают высокой мобильной способностью. К таким элементам относятся шестивалентный уран, семивалентный технеций и ряд других радионуклидов. Немалую опасность представляют также входящие в состав радиоактивных отходов тяжелые металлы и макрокомпоненты – нитрат- и сульфат-ионы (в концентрации до сотен граммов на дм<sup>3</sup>). Попадая в подземные экосистемы, компоненты радиоактивных отходов могут изменять в пластовой воде естественное соотношение доноров и акцепторов электронов и стимулировать микробиологические процессы, в первую очередь цикла серы и азота. Однако, дефицит доноров электронов и биогенных элементов, высокий солевой фон, а в ряде случаев и радиолитические процессы являются ограничивающим фактором деятельности микроорганизмов.

Целью данной работы является изучение возможности интенсификации микробных процессов для удаления и иммобилизации токсичных компонентов в подземных водах *in situ*. В качестве конечного результата предполагается создание технологии очистки загрязненных водоносных горизонтов от нитрат-, сульфат-, уранил-ионов и ряда радионуклидов.

Работа ведется на пробах из верхних водоносных горизонтов Сибирского Химического комбината г. Северск. Нами изучен видовой состав микробного сообщества загрязненных вод, выделены доминирующие компоненты и в лабораторных условиях проведена оценка возможности его интенсификации внесением в среду различных доноров электронов. На основании лабораторных исследований проведены полевые испытания на объекте ОАО «СХК», которые привели к очистке части загрязненного горизонта от нитрат-ионов до значений ниже ПДК. На данный момент ведется разработка комплексной очистки водоносных горизонтов на основе минеральных биогеохимических проницаемых барьеров, позволяющих одновременно удалять нитрат-ионы и иммобилизовать цезий, стронций, плутоний и другие радионуклиды.

*Проект поддержан грантом РФФИ №16-03-00153.*

## **Деструктивные изменения в составе углеводородов нефти для характеристики нуклеации газогидратов**

*Сваровская Л.И., Манаков А.Ю., Алтунина Л.К., Стрелец Л.А.*

ФГБУН Институт химии нефти Сибирского отделения РАН, Томск, sli@ipc.tsc.ru

Газовые гидраты – широко распространенные в природе соединения, представляющие кристаллический материал, где молекулы газа заключены в каркас молекул воды. Природные газогидраты образуются при высоком давлении и низкой температуре, что является типичными условиями добычи нефти в Арктике, где нефтепроводы проложены в холодном подводном окружении. Зародыши гидрата обычно образуются на границе раздела фаз: газ-вода-нефть и слипаются в большие гидратные кластеры, способные закупорить трубопроводы.

На состав и качество нефтей в природных резервуарах значительное влияние оказывают процессы биодеструкции углеводородов нефти. К группе углеводородокисляющих бактерий относятся представители родов: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthobakter*, *Micrococcus*, *Acinetobakter*, *Rhodococcus* и др. В процессе биодеградации формируются более тяжелые нефти, повышается их плотность и концентрация тяжелых полярных компонентов, увеличивается содержание NSO-соединений.

Образование гидратов в нефтяных дисперсных системах часто происходит при реакции растворенного в нефти попутного нефтяного газа с эмульгированной в нефти водой. При этом создаются оптимальные условия для протекания реакции гидратообразования – большая поверхность контакта нефть–вода и высокая концентрация газа в нефти, окружающего водные частицы.

Проведено исследование семи образцов нефтей MOF, VOF, VEOF, YuTOF, SOF, GOF, VAOF с разной степенью биодеструкции. Нефти отличаются по вязкости и плотности в нативном состоянии и в состоянии приготовленной эмульсии. Нефти маловязкие от 10.5 до 25.1 мПа·с, плотность не превышает 868 г/м<sup>3</sup> при 20 °С. При изучении нуклеации гидрата метана в эмульсиях воды в декане и в исследуемых нефтях выполнены политермические эксперименты. В работе исследованы переохлаждения от плюс 20 до минус 15 °С, необходимые для образования гидрата метана и льда из эмульсий воды в семи различных нефтях и в декане при давлении около 12 МПа. В изотермических экспериментах скорости нуклеации изменялись в следующем порядке: decane>YuTOF>MOF≈VEOF>VOF>VAOF>SOF>GOF. Показано, что температура, необходимая для нуклеации твердой фазы переохлаждений, имеют тенденцию увеличиваться с повышением плотности приготовленной эмульсии.

Показано, что температура, при которой происходит нуклеация твердой фазы, зависит от плотности приготовленной эмульсии: с увеличением плотности эмульсии температура увеличивается.

## **Иммобилизованные биокатализаторы в процессах метаногенеза: преимущества использования**

*Сенько О.В.<sup>1,2</sup>, Гладченко М.А.<sup>1,2</sup>, Слюсарев Д.А.<sup>3</sup>, Махлис Т.А.<sup>1</sup>, Ефременко Е.Н.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН

<sup>3</sup>Мытищинский филиал МГТУ им. Н. Э. Баумана (МГУЛ), elena\_efremenko@list.ru

По современным представлениям, одним из наиболее перспективных путей совместного решения экологических и энергетических проблем является активное использование метаногенеза для утилизации различных возобновляемых отходов. В частности, это может позволить агропромышленным комплексам перейти на практически полностью самостоятельное энергоснабжение. Интенсификация и оптимизация технологического оформления процессов метаногенеза - одна из важных задач современной биотехнологии.

Известны следующие основные проблемы при использовании традиционных биокатализаторов метаногенеза: - очень низкая скорость накопления биомассы анаэробного консорциума; - необходимостью для эффективного функционирования реактора для получения биогаза; - длительные процессы адаптации (несколько месяцев) к изменяющимся условиям применения (субстрат, его концентрация, рН среды и др.); - высокая чувствительность к присутствию токсикантов (веществ с антимикробной активностью) в средах с анаэробным илом, приводящая к гибели клеток.

Одним из возможных решений вышеобозначенных проблем является создание искусственно иммобилизованных образцов активного ила с высокими концентрациями клеток микроорганизмов, которые обеспечивают: - повышение стабильности клеток к негативному воздействию различных факторов (рН, инактивирующих химических агентов – своих метаболитов, чужих токсинов и др.) за счет эффекта «кворума»; - возможное увеличение концентрации клеток в реакторе при их равномерном пространственном распределении для повышения эффективности действия (увеличения степени конверсии субстратов, повышения доли метана в составе биогаза и др.).

В данной работе разработаны и протестированы высокоэффективные биокатализаторы в виде клеток анаэробных консорциумов, иммобилизованных в макропористый носитель, для конверсии в метан различных отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности. Анализ метаболитов, накапливающихся при этом в реакционной среде, показал существенное снижение по сравнению со стандартным процессом концентрации жирных кислот (пропионовой, масляной, уксусной), оказывающих существенное ингибирующее воздействие на процесс метаногенеза. Вследствие этого и уровень pH среды также остается более высоким, чем в стандартных условиях проведения процесса, что способствует созданию максимально благоприятных условий для метаногенеза. Продемонстрировано, что разработанные биокатализаторы позволяют увеличить метаногенную продуктивность процесса, и снизить длительность лаг-периода при смене одного субстрата на другой, отличающийся по химическому составу.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (Программа «Фундаментальные аспекты химии углеродной энергетики» №18).*

## **Иммобилизованные биокатализаторы в процессах получения высокомолекулярных полисахаридов**

*Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,  
elena\_efremenko@list.ru

Возрастающий рост объема производства синтетических пластмасс, не подлежащих биодegradации в условиях окружающей среды, создает глобальную экологическую проблему, поэтому разработка способов получения разнообразных биоразлагаемых природных полимеров из возобновляемого углеродсодержащего сырья является актуальной. По своим характеристикам полимеры, синтезируемые клетками микроорганизмов, близки к синтетическим, но при этом являются биосовместимыми и биоразлагаемыми. Сегодня открытыми остаются фундаментальные вопросы, связанные с пониманием теоретических основ процесса получения полисахаридов, и возможностью влияния на увеличение их выхода за счет изменения свойств самих клеток-продуцентов без их генетической модификации, получения полимеров заданного состава и свойств, увеличения скорости биосинтеза, а также возможностью расширения спектра субстратов, применяемых для культивирования продуцентов природных.

Привлекательным подходом к решению вышеизложенной проблемы представляется использование клеток-продуцентов полисахаридов в иммобилизованном виде. Известно, что иммобилизация обеспечивает значительное увеличение стабильности и сроков активного функционирования клеток продуцентов разных конечных продуктов к ингибирующему влиянию как самого субстрата, так и продукта, и токсичных веществ, присутствующих в средах. Кроме того, иммобилизация позволяет создавать в реакторе высокие концентрации клеток и при этом улучшать кинетические характеристики основного процесса за счет увеличения скорости процесса. Несмотря на привлекательность данного направления, в мире отсутствует опыт по использованию иммобилизованных клеток-продуцентов полисахаридов, хотя уже довольно хорошо изучены процессы биосинтеза других биополимеров – белков (ферментов) в биокаталитических системах на основе иммобилизованных высококонцентрированных популяций.

Основным преимуществом всех перечисленных полисахаридов является то, что их биосинтез осуществляется непосредственно клетками микроорганизмов. Стадия химической полимеризации, которая является неотъемлемой частью процессов получения биоразлагаемых полимеров из биотехнологически получаемых мономеров, например, органических кислот, в случае микроорганизмов-продуцентов полисахаридов - отсутствует.

В данной работе были получены иммобилизованные биокатализаторы (ИБК) в виде иммобилизованных в макропористый носитель клеток бактерий и дрожжей, способных синтезировать бактериальную целлюлозу, пуллулан и декстран. Продемонстрировано, что подобранный носитель не затрудняет выход полисахаридов из гранул с иммобилизованными клетками-продуцентами. Скорости накопления полисахаридов под действием ИБК выше в 1,2-3,6 раза, чем у суспензионных клеток, используемых в аналогичных условиях. Применение

ИБК позволило сократить в 1,4-1,6 раза длительность рабочих циклов клеток при синтезе ими полисахаридов с выходом, соизмеримым с уровнем выхода у свободных клеток.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант А № 16-08-00457).*

## **Антибактериальная активность нановолокон с иммобилизованным гентамицином против уропатогенных *Escherichia coli***

*Слукин П.В., Ермоленко З.М., Фурсова Н.К., Игнатов С.Г.*

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», Роспотребнадзора, Оболенск, info@obolensk.org

**Цель.** Определение антибактериальной активности нановолокон с иммобилизованным антибиотиком гентамицином в отношении госпитальных уропатогенных штаммов *Escherichia coli*.

**Материалы и методы.** Госпитальные штаммы *E. coli* К-19 (чувствительный к гентамицину), К-41 (устойчивый к гентамицину) и К-261 (устойчивый к гентамицину) выделены из мочи пациентов Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, г. Москва, с патологией мочевыделительной системы. Бактерии выращивали на среде Mueller-Hinton Agar (HiMedia, Индия). В эксперименте использовали нановолокна: «PCL-GMI» – нановолокна с ионно-иммобилизованным гентамицином; «PCL-dcc» – нановолокна с ковалентно-иммобилизованным гентамицином; «PCL-Ref» – нановолокна без гентамицина, контрольный образец, полученные из Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», г. Москва. Антибактериальную активность определяли по диаметру зоны подавления роста бактериального газона (0,1 мл суспензии с концентрацией клеток  $10^6$  КОЕ/мл) вокруг образца тестируемого образца площадью 25 мм<sup>2</sup>.

**Результаты.** Анализ наличия зон задержки роста бактериального газона вокруг образцов нановолокон показал, что нановолокна с разным типом иммобилизации гентамицина оказывали антибактериальное действие на уропатогенные штаммы *E. coli*. Контрольный образец нановолокон (без гентамицина) не подавлял роста ни одного из использованных штаммов. Диаметры зон подавления вокруг образцов «PCL-GMI» и «PCL-dcc» составили для гентамицин-чувствительного штамма *E. coli* К-19 28 и 26 мм; для гентамицин-устойчивого штамма *E. coli* К-41 – 16 и 16 мм; для гентамицин-устойчивого штамма *E. coli* К-261 – 22 и 20 мм, соответственно.

### **Выводы.**

1. Показано, что образцы нановолокон с иммобилизованным гентамицином обладали бактерицидным действием в отношении уропатогенных *E. coli*. Образцы нановолокон без гентамицина подобным действием не обладали.

2. Способ иммобилизации гентамицина на нановолокнах (ковалентное или ионное связывание) не оказывал существенного значения на уровень антибактериального действия в отношении штаммов уропатогенных *E. coli*.

3. Полученные данные свидетельствуют, что новые наноматериалы могут быть использованы при изготовлении изделий медицинского назначения и предметов ухода в урологии.

*Работа выполнена в рамках НИР №060 Роспотребнадзора.*

## **Создание биоконсерванта нового поколения на основе *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis***

*Стоянова Л. Г., Сультимова Т.Д., Нетрусов А.И.*

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, stoyanovamsu@mail.ru

Увеличение срока годности пищевых продуктов – задача, которую человечество пыталось решить уже с давних времен. Многие консерванты вызывают опасения у населения

вследствие своей токсичности и возможности подавления естественной микробиоты организма человека, к тому имеет место и приобретенная устойчивость к ним патогенов - контаминантов продуктов питания и пищевого сырья. Биоконсервация включает в себя процессы, направленные на увеличение сроков хранения продуктов, сырья, и, как следствие, повышение их общей пищевой и биологической ценности путем добавления ряда микроорганизмов и/или их антимикробных метаболитов. Особенности метаболизма лактококков *L.lactis ssp. lactis* с давних пор позволяют широко применять их в процессах консервирования благодаря их способности образовывать антимикробные вещества различной природы, которые могут стать альтернативой антибиотикам и консервантам. Ведущее место в объяснении явления антагонизма молочнокислых бактерий отводится специфическим веществам белковой природы – бактериоцинам. Эволюционно бактериоциногенная микроорганизмов возникла как приспособление к выживанию в условиях конкуренции - это один из способов занять подходящую экологическую нишу и является закономерным для большинства, если не для всех видов. Известный бактериоцин низин (препараты «Nisaplin» фирмы «Aplin & Barrett, Ltd», Англия и «Krisin» «Christian Hansen», Дания, пищевая добавка под кодом E-234) эффективен только против грамположительных бактерий. Из коровьего молока (район Бурятии) выделен штамм *L. lactis ssp. lactis* 194 (GenBank DQ 255954), обладающий широким спектром антимикробного действия, включая и фунгицидное, что является уникальным свойством для лактококков этого подвида. Штамм синтезирует комплекс, состоящий из активных компонентов, относящихся к разным классам химических соединений, два из которых не известны в базе данных биологически активных веществ (Berdy, 2005): бактериоцин - аналог низина А с молекулярной массой 3353 Да и второй пептид (M=2589Да), не содержащий лантионин, подавлял рост не только грамположительных, но и грамотрицательных бактерий), а также альдегид-содержащее органическое соединение алкил-фенильного ряда (M=209Да) против грибов из числа патогенов, колонизирующих продукты питания, сырье и вызывающих токсикоинфекции. Изучены механизмы регуляции синтеза этих новых эффективных компонентов. Штамм обладает антиоксидантной и протеолитической активностью, имеет высокий пробиотический потенциал. Создание консервантов на основе про- и пребиотиков рассматривается многими специалистами в рамках промышленного применения.

### **Микромицет *Aspergillus oryzae* как продуцент внеклеточных протеаз с активаторной активностью к белкам системы гемостаза**

*Тиморшина С.Н., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, timorshina.svetlana@mail.ru

Многие заболевания сердечно-сосудистой системы напрямую связаны с функционированием системы гемостаза, поддерживающей вязкость крови и ее свертывание за счет реакций, осуществляемых протеазами. Белки с подобными активностями встречаются и у микроорганизмов, в том числе у микромицетов. Так, например, *Aspergillus oryzae* является продуцентом внеклеточных протеаз с высокой прямой фибринолитической активностью. Помимо этого, известно, что протеазы некоторых аспергиллов (*A. ochraceus*, *A. terreus*) обладают активаторной активностью к протромбину, протеину С и Х фактору. Было выдвинуто предположение, что протеолитические ферменты *A. oryzae* также способны осуществлять конверсию белков-проферментов системы гемостаза в активные протеазы. Для проверки этой гипотезы были использованы хромогенные пептидные субстраты, расщепляемые протеазами системы гемостаза, в том числе с прединкубацией с плазмой крови человека. Было показано, что протеазы *A. oryzae* обладают высокой общей активаторной активностью ( $47,4 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ ), а также активаторной активностью к протеину С ( $31,4 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ ) и Х фактору ( $1,2 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ ), что характерно для протеаз микромицетов данного рода. Активаторная к протеину С оказалась выше, чем у ранее изученных *A.alliaceus* и *A.nidulans* (28,4 и 4,8 Е/мл, соответственно). Незначительное значение активаторной к Х фактору активности по сравнению с активаторной к протеину С может указывать на высокую субстратную специфичность секретируемых *A. oryzae* протеаз и перспективу их применения в качестве компонентов антикоагулянтных препаратов.



## **«Косметика» для микроорганизмов: наномодифицированные микробные клетки в биотехнологии**

*Фахруллин Р. Ф.*

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,  
Казань

Инженерия клеточной поверхности возникла как междисциплинарное направление, основной задачей которого является модификация защитных оболочек клеток с помощью наноматериалов различной природы (металлические, оксидные и углеродные наночастицы, минеральные оболочки, полимерные пленка, и их различные комбинации) [1]. Формирование искусственных оболочек на поверхности живых клеток позволяет получать так называемые «клетки-киборги» [2], сочетающие в себе как исходные, так и привнесенные полезные свойства. Микроорганизмы рассматриваются как весьма перспективные и удобные объекты для инженерии клеточной поверхности [3]. Разработаны методы модификации клеточных стенок бактерий, одноклеточных водорослей и грибов, позволяющие заключить изолированные клетки в индивидуальные полупроницаемые оболочки [4], сформированные из полиэлектролитов, магнитных наночастиц и наночастиц благородных металлов, нанотрубок (углеродные нанотрубки, нанотрубки галлуазита) [5]. Также получены искусственные споры, состоящие из индивидуальных микробных клеток, заключенных в жесткие неорганические оболочки из карбоната кальция или оксида кремния [6]. «Клеток-киборги» были с успехом применены для разработки биосенсоров и микрофлюидных устройств, в катализе и для направленной доставки клеток [1]. Работа выполнена в рамках ППК КФУ.

## **«Клетки-киборги» для доставки нанотрубок галлуазита в организм нематоды *Caenorhabditis elegans***

*Фахруллина Г.И., Ахатова Ф.С., Гаязова Э.И., Фахруллин Р.Ф.*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, [kazanbio@gmail.com](mailto:kazanbio@gmail.com)

Применение моделей *in vivo* в системе холобионта (хозяин-микробиота) перспективно для исследования влияния наноматериалов на живые организмы, так как воздействие наночастиц на организм может быть опосредовано кишечными симбионтами. Наночастицы могут оказывать влияние на жизнеспособность макроорганизма путем изменения состава и метаболизма микроорганизмов. Поэтому влияние наночастиц на живой организм необходимо изучать в симбиотической системе холобионта. Свободноживущая многоклеточная нематода *Caenorhabditis elegans*, которая питается микроорганизмами, являющимися одновременно источником пищи и кишечной микрофлорой, является удобным объектом для изучения токсичности наноматериалов. Нанотрубки галлуазита активно используются в полимерной промышленности, что стимулирует исследования по оценке их токсичности.

Для управляемой доставки наночастиц в организм нематод использовали бактерии *Escherichia coli*, на поверхность которых путем послойного нанесения противоположно-заряженных полиэлектролитов иммобилизовали галлуазитные нанотрубки [1]. Оценку эффективности присоединения нанотрубок к клеточным стенкам изучали методами лазерной велосиметрии Доплера и темнопольной микроскопии.

Нематоды активно поедают наномодифицированные клетки, при этом нанотрубки проникают в организм нематод и накапливаются исключительно в пищеварительном тракте. Экспозиция нанотрубками галлуазита в течение 72 часов вызывает зависимое от концентрации ингибирование роста тела нематод и не оказывает значительного эффекта на репродуктивность и термостабильность. Нанотрубки галлуазита не вызывают выработку активных форм кислорода и не приводят к преждевременному старению организма. Установлено, что воздействие бактериями, покрытыми нанотрубками галлуазита, в течение 16 дней не приводит к существенному снижению продолжительности жизни нематод.

*Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.*

1. G. I. Fakhru'llina, F.S. Akhatova, Y.M. Lvov, R.F. Fakhru'llin "Toxicity of halloysite clay nanotubes in vivo: a *Caenorhabditis elegans* study", *Environ Sci: Nano*, 2015, 2, 54.

## Трансформация стероидных соединений умеренно термофильными актинобактериями *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ас-666

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

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

Термофильные микроорганизмы находят широкое применение благодаря их многочисленным преимуществам по сравнению с традиционно используемыми мезофильными штаммами: способности выдерживать повышенные температуры и противостоять влиянию органических растворителей, детергентов и других агрессивных внешних факторов (1).

В настоящее время ферменты термофильных микроорганизмов широко используются в биотехнологиях производства моющих средств, пищевых продуктов, кормов, в целлюлозно-бумажной, текстильной и добывающей промышленности, переработке различных отходов (2). Однако сообщения об использовании термофильных бактерий, специфически модифицирующих стероиды, встречаются крайне редко (3). Так, сообщалось, что некоторые бактериальные термофильные микроорганизмы способны осуществлять модификации стероидов (4,5). Почвенная умеренно термофильная бактерия *Geobacillus stearothermophilus* модифицировала производные прогестерона и тестостерон с образованием гидроксильированных 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  $\Delta^4$ -двойной связи в различных стероидных кетонах, таких, как прогестерон (9).

Ранее нами было показано, что актинобактериальный штамм *Saccharopolyspora hirsuta* ВКМ Ас-666 способен трансформировать литохолевую кислоту (10). Умеренно термофильный штамм *S. hirsuta* был выделен ранее 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 реакцию дезацетилирования по положению 21 соответствующих сложных стероидных эфиров, модификацию 3 $\beta$ -гидрокси-5-ен- в 3-кето-4-ен-структуру, эффективно катализировал 1(2)-дегидрирование. Штамм способен к деградации боковой цепи С21 стероидов. Культура также осуществляла 17 $\beta$ /20 $\beta$ -восстановление 17-кето/20-кетогруппы, соответственно.

Таким образом, впервые исследован каталитический потенциал умеренно термофильных актинобактерий *S. hirsuta* ВКМ Ас-666 в отношении биоконверсии различных стероидных субстратов. Результаты свидетельствуют о перспективности использования этого штамма в производстве стероидных лекарств.

- (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.

# Развитие и функционирование микроорганизмов в целостной системе переработки апатит-нефелиновых и медно-никелевых руд Мурманской области

Фокина Н.В., Янышевская Е.С., Мязин В.А., Светлов А.В.

Институт проблем промышленной экологии Севера Кольского научного центра РАН, Апатиты,

Как известно, минерально-сырьевые ресурсы Мурманской области представлены крупными запасами апатит-нефелинового и медно-никелевого сырья. Работы по изучению функционирования микроорганизмов в целостной системе переработки апатит-нефелиновых и медно-никелевых руд на обогатительных фабриках ОАО "Апатит" и Кольской ГМК показали, что наименьшая численность как сапротрофных, так и других трофических групп бактерий наблюдается в образцах руды и оборотной воды как на фабрике АНОФ-2, так и на комбинате "Печенганикель". По ходу флотации бактерии, поступающие с рудой и оборотной водой, идущей с хвостохранилищ, увеличивают свою численность за счет поступления питательных веществ с флотореагентами, аэрации и более высокой температуры.

Из оборотной воды и основных продуктов флотации выделены штаммы бактерий, частота встречаемости которых составила более 60 %, они относятся к роду *Pseudomonas*. На ОАО "Апатит" обнаружены еще 2 штамма с частотой встречаемости более 60%, относящиеся к роду *Stenotrophomonas* и *Acinetobacter*. Численность грибов в цикле обогащения апатит-нефелиновой руды на фабриках очень низкая (от 1 до 24 КОЕ/1 мл или 1 г руды). Доминировали грибы рода *Penicillium*, встречались грибы родов *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Chaetomium*. На комбинате "Печенганикель" выделены виды *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium aurantiogriseum* и *P. glabrum*. Обнаружено, что бактерии ухудшают флотируемость апатита за счет взаимодействия с активными центрами кальцийсодержащих минералов и интенсивной флокуляции, приводящей к снижению селективности процесса флотации.

Лабораторные опыты по флотации исходной медно-никелевой руды на водопроводной воде в фабричном режиме показали, что в присутствии доминирующих бактерий и с увеличением их численности время флотации увеличивается.

В 2016 г. сотрудниками лаборатории начаты исследования, связанные с процессами биовыщелачивания меди и никеля на примере отвалов Аллареченского месторождения. Результаты показали невысокую численность и трофическое разнообразие микроорганизмов. В пробах воды были выявлены тионовые и сульфатредуцирующие бактерии, способствующие бактериальному выщелачиванию сульфидных руд. Полученные образцы имеют кислую реакцию среды, благоприятную для развития этих микроорганизмов. Совместно с сотрудниками лаборатории экологии промышленного производства начаты работы по их использованию в процессах выщелачивания, с целью в дальнейшем перейти к изучению возможностей кучного выщелачивания.

Экспериментальные исследования по выщелачиванию богатых руд, с содержанием Ni 5.8% и Cu 2.9%, показали большую эффективность бактериального выщелачивания по отношению к выщелачиванию 2% раствором серной кислоты. Так, за 51 сутки в варианте с использованием бактерий перешло в раствор 2,7 % никеля и 0,2% меди, в то время как в варианте с серной кислотой – 0,6 и 0,04% соответственно. Полученные результаты позволяют перейти к опытам с бедной рудой.

## Микробные технологии для очистки стоков от пиридинов

Хасаева Ф. М.

ФГБОУ ВО «Кабардино Балкарский государственный аграрный университет им. Кокова», Нальчик,  
khasaeva@yandex.ru

Пиридины являются компонентами сырой нефти в составе наиболее токсичной его фракции, образуются и содержатся в стоках нефтеперерабатывающих и химических предприятий, используются в качестве растворителей, для получения красителей, на их основе синтезируют гербициды и многие фармацевтические препараты. Хорошая

растворимость пиридинов в воде обеспечивает легкость их транспорта и распространения в окружающей среде.

Санитарное законодательство ПДК пиридинов в воздухе и в воде строго регламентирует, что обуславливает необходимость глубокой очистки сточных вод.

Биохимический метод очистки промышленных стоков с использованием активного ила не оправдал себя при обезвреживании стоков, с высокими концентрациями токсичных соединений и оказывается малоэффективным.

Поиск активных культур с повышенной деструктивной активностью, их всестороннее изучение и создание новой системы их использования, позволило бы оградить микрофлору активного ила от воздействия высокотоксичных компонентов.

Методом накопительных культур были выделены штаммы-деструкторы, отнесенные к роду *Arthrobacter*, успешно утилизирующие в высоких концентрациях пиридин, 2-метил- 4-метил- и 2,6-диметилпиридины.

Исследование путей деградации пиридинов штаммами *Arthrobacter* sp. проводили в экстрактах КЖ, сконцентрированной в 10 раз, в динамике роста культур. В ходе исследований удалось выделить и идентифицировать интермедиаты, что позволило предложить гипотетические пути катаболизма изучаемых токсикантов.

Использование в очистных сооружениях иммобилизованных клеток микро-организмов, вместо свободно растущих клеток, открывает новые возможности биотехнологии. В качестве носителя для иммобилизации клеток *Arthrobacter* sp. был использован Са-альгинатный гель. Показана высокая эффективность иммобилизованных клеток для деградации пиридинов, что позволяет рекомендовать *Arthrobacter* sp для разработки биотехнологии очистки от пиридинов сточных вод и биоремедиации почв.

Для длительного хранения высокоактивного штамма *Arthrobacter* sp. нами были использованы методы лиофилизации и криоконсервации на различных защитных средах. В результате «теста на ускоренное хранение», лиофилизация на лошадиной сыворотке с 5% мезо-инозита показало, что за 25 лет хранения количество жизнеспособных клеток и утилизирующая активность штаммов сохранились на первоначальном уровне.

## **Иммобилизация противоопухолевой рибонуклеазы биназы на нанотрубках галлуазита**

*Ходжаева В.С., Макеева А.Н., Ульянова В.В., Зеленихин П.В., Ильинская О.Н.*

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань,  
khojaewa.vera@mail.ru

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что микробные рибонуклеазы (РНКазы) оказывают селективное цитотоксическое действие на ряд раковых клеток, при этом они нечувствительны к ингибитору РНКаз млекопитающих. Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* (биназа) избирательно поражает злокачественные клетки, вызывая их апоптическую гибель, в связи с чем данный фермент можно рассматривать как перспективный объект для создания новых препаратов при терапии злокачественных новообразований. Избежать побочных эффектов цитотоксических противораковых препаратов отчасти помогает их упаковка в разнообразные нейтральные носители, которые также повышают концентрации действующего вещества в клетках-мишенях благодаря перманентному выходу фермента. В качестве такого носителя мы использовали биосовместимые нанотрубки галлуазита (ГНТ). Мы предполагаем, что иммобилизация биназы на ГНТ обеспечит пролонгированное действие биназы, что соответственно снизит частоту приема препарата.

Оценку иммобилизации фермента на ГНТ проводили с помощью измерения каталитической активности фермента в супернатанте, при поглощении фермента при А280. Просвечивающая электронная микроскопия показала наличие фермента в виде гранул во внутреннем просвете нанотрубок, при этом на фотографиях пустых нанотрубок таких гранул не обнаруживается.

Оценку жизнеспособности клеток линии А375 (меланома человека) и линии Colo320 (колоректальный рак) проводили с помощью окрашивания флуоресцирующими красителями 3,3'-3,3'-дигексилоксакарбоцианин иодидом и иодидом пропидия. Наши исследования показали, что добавление биназы, иммобилизованной на ГНТ (в концентрации 100 мкг/мл), снижает

жизнеспособность клеток колоректального рака на 62%, клеток меланомы – на 60%, что в 2 раза превышает цитотоксический эффект, вызванный свободной биназой в той же концентрации. Нанотрубки сами по себе не оказывали цитотоксического действия на клетки в концентрации до 600 мкг/мл.

Важно отметить, что ГНТ не являются биodeградируемым субстратом, поэтому их наружное применение представляется наиболее безопасным. Таким образом, мы рассматриваем использование системы биназы, иммобилизованной на трубках, как перспективное средство для аппликаций в качестве ректальных суппозитория в борьбе с колоректальным раком, и злокачественными перерождениями кожи.

## **Исследование биодеструкции дегидроабиединовой кислоты с использованием актинобактерий**

*Черемных К. М.<sup>1,2</sup>, Лучникова Н. А.<sup>2</sup>, Гришко В. В.<sup>3</sup>, Ившина И. Б.<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, kseniya.cheremnikh@gmail.com, ivshina@iegm.ru

<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, luchnikova.n@mail.ru

<sup>3</sup>Институт технической химии УрО РАН филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, grishvic@gmail.com

Дегидроабиединовая кислота (ДАК), детектируемая в сточных водах целлюлозно-бумажной промышленности в относительно высоких (до 500 мг/л) концентрациях, – одна из наиболее токсичных смоляных кислот, продуцируемых хвойными растениями. С использованием биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegm.ru/iegmcol, реестровый номер уникальной научной установки 73559) отобраны штаммы, способные к полной (*Gordonia rubripertincta* ИЭГМ 107) или частичной (*Rhodococcus qingshengii* ИЭГМ 267) биодеструкции ДАК (500 мг/л) в условиях предварительного выращивания актинобактерий в течение 2 сут в присутствии *n*-гексадекана (0,1 об.%). Продолжительность процесса биодеструкции ДАК – 7 сут.

По нашим данным, минимальная подавляющая концентрация ДАК по отношению к исследованным культурам гордоний и родококков составляла 780 мг/л и 24 мг/л, соответственно. При использовании гордоний первоначальное снижение численности жизнеспособных клеток, наблюдаемое в течение первых 2 сут после добавления ДАК в минеральную среду, сопровождалось резким увеличением через 72 ч их каталитической активности. В процессе биодеструкции ДАК родококками наблюдалось достоверное снижение численности их жизнеспособных клеток в 1,5–2,8 раза. Внесение ДАК в среду культивирования приводило к повышению уровня респираторной активности у гордоний и родококков в течение всего процесса биодеструкции. С использованием совмещенной системы атомно-силовой и конфокальной лазерной микроскопии показано формирование клеточных агрегатов размером 0,5 мкм для гордоний и 5 мкм для родококков, увеличение размеров клеток и показателей среднеквадратичной шероховатости клеточной стенки, что является ответной реакцией актинобактерий на присутствие экотоксиканта.

*Работа выполнена в рамках расширенного государственного задания по биоресурсным коллекциям институтов ФАНО и государственного задания 6.3330.2017/4.6 Министерства образования и науки Российской Федерации.*

## **Утилизация соломы зерновых культур в полевых условиях с помощью аборигенного штамма *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016**

*Черепухина И.В., Безлер Н.В.*

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л.Мазлумова, Воронежский государственный университет, icherepukhina@gmail.com

Запашка в почву соломы зерновых культур может быть эффективным способом поддержания и восстановления плодородия. В настоящее время активно развивается биологическое земледелие, выделяются новые штаммы микроорганизмов, появляются биопрепараты, способные значительно повысить эффективность применения растительных остатков соломы. Для каждого конкретного типа почв должны быть предусмотрены характерные для него способы заделки побочной продукции. Для чернозёма выщелоченного с этой целью можно использовать аборигенный штамм целлюлозолитического микромицета *Humicola fuscoatra* ВНИИСС 016, который был выделен из чернозёма выщелоченного в лаборатории эколого-микробиологических исследований почв ВНИИСС им. А.Л. Мазлумова.

В лабораторных условиях был проведен опыт по изучению динамики убыли массы соломы. Остатки соломы после уборки урожая измельчали, затем 4 г растительных остатков помещали в чашки Петри, увлажняли до 60% ППВ и оставляли в термостате на 2 месяца. В результате исследований было установлено, что при использовании *Humicola fuscoatra* происходит увеличение скорости деструкции соломы озимой пшеницы на 44,9% и соломы ячменя на 56,0%.

В 2011 году на новом опытном поле ВНИИСС был заложен многолетний полевой опыт с запашкой соломы озимой пшеницы и ячменя в соответствии с ротацией зернопаропропашного севооборота (пар–озимая пшеница–сахарная свёкла–ячмень). Общая площадь полевого опыта составила 1209,6 м<sup>2</sup>, площадь делянки – 75,6 м<sup>2</sup>. Норма внесения соломы – 4-5 т/га, азотного удобрения – 40 кг д.в. на гектар, питательной добавки (ПК) – 200 л/га (1:1000).

В результате исследований установлено, что запашка соломы озимой пшеницы и ячменя с целлюлозолитическим микромицетом, способствует созданию благоприятных условий для развития основных таксономических, физиологических и эколого-трофических групп микроорганизмов и, в частности, принимающих участие в трансформации соединений углерода в почве (зимогенной и целлюлозоразрушающей). При использовании *Humicola fuscoatra* выявлено увеличение активности ферментов, отвечающих за синтез гумусовых веществ и, как следствие, повышение содержания гумусовых веществ в почве. Установлено также положительное влияние такой технологии на улучшение фотосинтетических процессов в листовом аппарате сахарной свеклы вследствие более активной эмиссии углекислого газа из почвы. Коэффициент продуктивности фотосинтеза составил 7,00, в то время как при использовании одной соломы – 3,98, что, в конечном итоге, сказывалось и на урожайности культуры, которая была выше контроля на 29,1%, использования одной соломы – на 24,9%, соломы с азотным удобрением – на 20,0%.

Таким образом, представляется возможным внедрение *Humicola fuscoatra* для создания микробиологического препарата, который может быть использован для ускорения разложения соломы зерновых культур и в результате – повышения почвенного плодородия.

## **Экзогенная бактериальная рибонуклеаза оказывает противогриппозное действие при проникновении в клетки эукариот**

*Шах Махмуд Р.<sup>1</sup>, Ульянова В.В.<sup>1</sup>, Мустафа А.<sup>2</sup>, Ильинская О.Н.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Кафедра микробиологии ИФМиБ, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, raihan.shah@gmail.com

<sup>2</sup>Институт медицинской вирусологии, Гиссенский университет имени Юстуса и Либига, Шуберт Гиссен, Германия

Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* (биназа) проявляет противовирусное действие в отношении различных вирусов в организме животных и культуре клеток. Несмотря на многочисленные работы, противовирусные мишени биназы до сих пор не установлены. В связи с этим целью настоящей работы явилось установление действия биназы против пандемического вируса гриппа А (H1N1) на молекулярном уровне.

В исследовании мы использовали легочные клетки человека A549 и вирус гриппа А (H1N1pdm). Влияние биназы на капсид-защищенный вирус и мРНК вируса в клетках проверяли методами ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени, соответственно. Обработку зараженных клеток биназой (1-10 мкг/мл) проводили тремя способами: 1) клетки преинкубировали с биназой в течение 4 ч до заражения, 2) биназу преинкубировали с вирусом в течение 45 мин до

заражения клеток, 3) биназу добавляли без преинкубации. После заражения в каждом случае клетки инкубировали в течение 12 или 24 ч.

Было установлено, что концентрация биназы 10 мкг/мл, не являющаяся токсичной по отношению к клеткам, не разрушала кодируемый вирусной РНК белок РВ2 у капсид-защищенного вируса вне клеток. Биназа подавляла накопление вирусных мРНК, кодирующих белок NP в вирус-зараженных и биназа-обработанных клетках после одноциклового (12 ч) размножения вируса. Рибонуклеаза в концентрации 1-10 мкг/мл более чем 1,7 раз снижала титр вируса во всех трех вариантах эксперимента. Фермент в концентрации 10 мкг/мл являлся более эффективным при многоциклового (24 ч) размножении вируса в случае пре-инкубации биназы с вирусом или клетками. Не контактируя с вирионами вне клеток, биназа (10 мкг/мл) при проникновении в клетки подавляла репродукцию дочерних вирусов в 2,6 раз после многоциклового размножения вируса. Во время пре-инкубации биназы с вирусом, биназа (10 мкг/мл) подавляла титра вируса в клеточной среде в 2,5 и 2,7 раз после одно- и многоциклового размножения вируса, соответственно.

Полученные нами результаты подтверждают, что отсутствует прямое действие биназы на интактный вирус H1N1pdm, биназа действует на вирус внутри клеток A549. Таким образом, наше исследование подтверждает, что биназу можно использовать против вируса гриппа независимо от его антигенного разнообразия для профилактики гриппа или после заражения вирусом. Наиболее эффективное действие против вируса гриппа биназа оказывает непосредственно в момент заражения.

## **Особенности генетической организации локуса *LtbR* коринеформных штаммов и его модификации, приводящие к увеличению биосинтеза лизина**

*Шустикова Т.Е., Рябченко Л.Е., Яненко А.С.*

ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов", Москва, genetika@genetika.ru, idenetic@yandex.ru

Незаменимую аминокислоту L-лизин, широко используемую в качестве кормовой добавки для животноводства и птицеводства, традиционно получают ферментацией сахаров с помощью коринеформных бактерий, таких как *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* и *Brevibacterium lactofermentum*. Современные штаммы, используемые для промышленного производства L-лизина, содержат комплекс мутаций в геноме, обеспечивающих сверхпродукцию L-лизина. К таким мутациям относятся модификации генов биосинтеза лизина, цикла трикарбоновых кислот, гликолиза, а также генов глобальных регуляторов.

Одним из таких регуляторов является транскрипционный регулятор *LtbR*, относящийся к IclR-семейству регуляторных белков. Он оказывает плейотропный эффект на работу большого числа генов. Было проведено сравнение генетической организации локусов *LtbR* у разных штаммов *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*. Обнаружено, что последовательность гена *LtbR* на 99-100% идентична во всех штаммах, однако межгенные области (последовательности около 250 п.н., расположенные между генами *LtbR* и *LeuC*) различаются. У штамма *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 в составе межгенной области содержатся две консенсусные последовательности в 12 п.н., расположенные непосредственно перед старт-кодонами генов *LtbR* и *LeuC*, с которыми предположительно связывается регуляторный белок LtbR. В то же время у штамма *Brevibacterium flavum* ATCC13869 межгенная область содержит только одну 12-нуклеотидную последовательность, расположенную на значительном расстоянии от старт-кодона гена *LeuC*.

На основе штамма ATCC13869 сконструированы продуценты лизина и изучено влияние модификаций как самого гена *LtbR* так межгенной области на продуктивность штамма. В результате работы обнаружено, что модификация или замена области, содержащей 12-нуклеотидную последовательность не сказывалась на продукции лизина, однако инактивация самого гена *LtbR* приводила к существенному увеличению биосинтеза лизина.

# Съезд Межрегионального Микробиологического Общества

## Страницы истории Всесоюзного микробиологического общества

*Колотилова Н.Н.*

ФГОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,  
биологический факультет, Москва, kolotilovan@mail.ru

История Всесоюзного микробиологического общества и его преемников отражает ключевые моменты истории нашей страны. В 1957 г. Постановлением Президиума АН СССР было одобрено решение об организации Всесоюзного общества микробиологов. В 1958 г. оно было переименовано во Всесоюзное микробиологическое общество (ВМО), устав которого был принят в январе 1960 г. на I Всесоюзном делегатском съезде ВМО. Инициатором создания и первым президентом Общества (1960-1963) был А.А.Имшенецкий, затем ВМО возглавляли: Е.Н.Мишустин (1963-1968), И.Л.Работнова (1968-1971), М.Н.Мейсель (1971-1975), Е.Н.Кондратьева (1975-1986), Г.К.Скрябин (1986-1989), М.В.Иванов. В годы существования СССР было организовано 8 Всесоюзных съездов ВМО (1960, Москва; 1963, Москва; 1968, Киев; 1971, Минск; 1975, Ереван; 1980, Рига; 1985, Алма-Ата). Общество играло активную роль в научной жизни страны. В середине 1980-х годов оно насчитывало более 5000 членов и переживало период расцвета.

После распада Советского Союза началась работа по организации Российского микробиологического общества (РМО) при РАН как правопреемника ВМО. Для его создания необходимо было получить соответствующие официальные согласия от всех республиканских отделений ВМО, и они были получены. В январе 1992 г. в Пущино состоялся Учредительный съезд РМО, на котором был принят Устав РМО; президентом Общества был избран М.В.Иванов. Однако в 1990-е годы не все вопросы, связанные с юридическим оформлением Общества, были решены, а документов о его деятельности в этот сложный период нашей истории практически не сохранилось.

В 2003 г. состоялся новый Учредительный съезд Микробиологического общества, которое в 2004 г. было зарегистрировано Министерством юстиции РФ под названием

Межрегиональная общественная организация содействия развитию творческой деятельности ученых, инженерно-технических работников, преподавателей и учащихся в области микробиологии и сопредельных дисциплин «Микробиологическое общество» (МОО Микробиологическое общество). Президентом Общества с 2004 г. был В.Ф.Гальченко, а с 2016 г. является Е.А.Бонч-Осмоловская; сегодня деятельность Общества активно развивается.

## Ближайшие и долгосрочные перспективы работы ММО

*Бонч-Осмоловская Е.А.*

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, elizaveta.bo@gmail.com

Микробиологическое Общество в нашей стране существует 60 лет. За это время коренным образом изменилась не только страна - огромные изменения произошли и в микробиологии. Появление геномных технологий позволило построить филогенетическую систему прокариот, подняло на новый уровень исследования в области микробного метаболизма и микробной экологии. Новое время отличается также постоянно расширяющимися возможностями коммуникаций и огромным потоком новой информации. Какова же роль Микробиологического Общества в этом новом мире?

Выбранный на 4 Съезде ММО Президиум Общества видит свою главную задачу в создании площадок для общения российских микробиологов, где они могли бы обмениваться опытом исследований, критически оценивать результаты друг друга, создавать исследовательские консорциумы для решения крупных задач современной микробиологии.

В настоящее время уже работает новый сайт Общества, на котором мы будем стараться размещать не только новости о конференциях, симпозиумах, грантах, но и сообщения о крупнейших событиях в российской и зарубежной науке. Также планируется публикация



содержания очередных номеров журнала "Микробиология", объявлений о вакансиях, информации о юбилейных датах нашей науки и посвященные им краткие исторические сводки.

Активизация работы общества будет, как мы надеемся, происходить с помощью региональных отделений и их председателей. В настоящее время в ММО состоит 629 человек, которые входят в состав 16 региональных отделений. В задачи региональных отделений входит привлечение новых членов, проведение семинаров и тематических конференций, объявления о которых также будут размещаться на сайте Общества.

Особо важную роль общества мы видим в работе с молодыми учеными, для которых крайне важны контакты и со сверстниками, и с учеными старшего поколения, представляющими различные научные школы и направления.

Наконец, важнейшими событиями в жизни любого научного общества являются съезды. Мы хотим сделать съезды ММО регулярными и надеемся, что все большее количество членов Общества сможет принимать в них участие.

ММО является членом FEMS, и это несомненная заслуга предыдущего состава Президиума Общества. Наша задача - как можно более полно использовать возможности, которые предоставляет FEMS, и мы будем постоянно информировать о них членов ММО.

Реализация всех этих планов невозможна без обратной связи, и мы очень надеемся, что члены общества своей критикой и конструктивными предложениями помогут нам наладить активную работу ММО в кратчайшие сроки. Авторитет российской микробиологии в мире по-прежнему высок, и наше национальное Микробиологическое Общество должно быть достойно этой славы.

ООО – фирма «Проинтех»  
Разработка и производство  
сложного биотехнологического оборудования

**P.I.T.**  
Российское предприятие  
основано в 1994г.

**Лиофильные сушилки**

Серебряная медаль -  
«Архимед - 2016»



**Ферментеры лабораторные**

Золотая медаль -  
«МИР биотехнологии -  
2006»



**Ферментеры промышленные**



**Лабораторное оборудование**

1. Качалки напольные
2. Ламинарные боксы  
РУ № ФСР 2012/13215
3. Установки для ультра- микро-  
фльтрации УМФ
4. Смесители «пьяная бочка»
5. Климатические камеры
6. Магнитные мешалки
7. Кассеты для пробирок
8. Разработка биотехнологического  
оборудования по ТЗ Заказчика



①



②



③



④



⑤

ООО - фирма «Проинтех» разрабатывает и производит сложное биотехнологическое оборудование: лиофильные сушилки, ферментеры и комплексы ферментеров, климатические камеры и др. При производстве большое внимание уделяется надежности работы приборов, современным функциям и внешнему виду. Мы не теряем контакт с потребителями и вносим улучшения в конструкции приборов в соответствии с их рекомендациями.

Мы стараемся максимально адаптировать наше оборудование к задачам заказчика: вводим новые функции, предлагаем широкий выбор комплектации (исполнительные устройства, датчики и пр.).

В связи с образовавшейся широкой и надежной сетью поставщиков импортной комплектации, мы имеем возможность заказать и поставить для Вас комплектующие изделия, а также лабораторное оборудование любых зарубежных фирм.

ООО - фирма «Проинтех» 142290 Московская обл. г. Пущино, ул. Строителей д.5.

Сайт [www.pit-bio.ru](http://www.pit-bio.ru). Электронная почта [vth@mail.ru](mailto:vth@mail.ru).

Т./ф. (4967) 73-50-43. М./т. (916) 980-79-03.

# Эффективное культивирование



aquilabiolabs

INFORS HT



## Знаменитый биореактор Minifors 2 – теперь в новом исполнении!



**Minifors, Infors**, по-прежнему наиболее экономичный бактериальный биореактор для рутинного культивирования:

- все необходимое для начала работы входит в комплект поставки – заказал, распаковал и приступил к работе;
- идеальный аппарат как для наработки продукта, так и для новичков, переходящих от культивирования в шейкере к ферментерам.

**Minifors 2** дает еще больше возможностей:

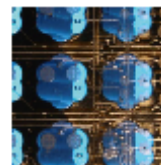
- сменные сосуды: 1,5; 3 и 6 л (общий объем);
- современный эргономичный дизайн;
- не требуется подключение к ПК;
- меню на русском языке.

**Комплект поставки:** сосуд, контроллер с сенсорным экраном, цифровые датчики pH и  $pO_2$ , две газовые линии для воздуха и  $O_2/N_2$ , два автоматических регулятора массового расхода газов (MFC), 4 конфигурируемых насоса, конденсор газов, пеногашение, порты для ввода образцов и реагентов, OPC-сервер. Опции: датчик биомассы, анализатор газов, весы для контроля подпитки, ПО eve для полного контроля за биопроцессом.

## 48 ферментаций одновременно!

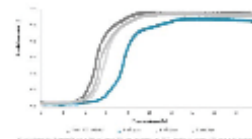
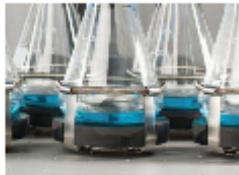
Микропланшетные биореакторы для скрининга и подбора условий, M2p-labs

**BioLector (Pro)** — микробиореактор для культивирования микроорганизмов в специальных планшетах. Дно каждой лунки планшета оснащено неинвазивными датчиками, позволяющими отслеживать ОД/флуоресценцию, pH,  $pO_2$ . Планшеты **BioLector Pro** оснащены микрофлюидными капиллярами к каждой лунке для подпитки средой и поддержания необходимого pH.



## Автоматический он-лайн мониторинг биомассы в колбах Счетчик роста клеток CGQ, Aquila Biolabs

- Объемы колб, мл — 250, 500, 1000 и 2000;
- диапазон измерения оптической плотности  $OD_{600}$  — от 0,2 до 50;
- параллельный мониторинг колб, шт. — 1–16.



## 000 «Диаэм»

[www.dia-m.ru](http://www.dia-m.ru)

**Москва**  
ул. Магаданская, 7, к. 3  
тел./факс:  
(495) 745-0508  
sales@dia-m.ru

**Новосибирск**  
пр. Акад.  
Лаврентьева, 6/1  
тел./факс:  
(383) 328-0048  
nsk@dia-m.ru

**Казань**  
ул. Парижской  
Коммуны, д. 6  
тел/факс:  
(843) 210-2080  
kazan@dia-m.ru

**С.-Петербург**  
ул. Профессора  
Попова, 23  
тел./факс:  
(812) 372-6040  
spb@dia-m.ru

**Ростов-на-Дону**  
пер. Семашко, 114  
тел./факс:  
(863) 250-0006  
rnd@dia-m.ru

**Пермь**  
Представитель  
в УФО  
тел./факс:  
(342) 202-2239  
perm@dia-m.ru

**Воронеж**  
Представитель  
тел./факс:  
(473) 232-4412  
voronezh@dia-m.ru

**Армения**  
Представитель  
тел.  
094-01-01-73  
armenia@dia-m.ru





## Все для Вашей успешной работы в лаборатории!



Наборы для выделения нуклеиновых кислот и белков  
Реагенты для биохимических исследований

Питательные среды для клеточных культур  
Тест-системы микробиологического контроля

Проточные цитометры и аналитическое оборудование  
Большой выбор расходных материалов

Лабораторный пластик и стекло





## НОВЫЕ ИДЕИ НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НОВЫЕ ЦЕННОСТИ

Компания «МИЛЛАБ» с 1996 года специализируется на поставках аналитического, испытательного, лабораторного, реакторного, вакуумного и термического оборудования ведущих мировых брендов для эффективного решения различных задач в лабораториях и на производстве

«МИЛЛАБ» представляет готовые решения для лабораторного, пилотного и промышленного синтеза и оказывает услуги по индивидуальному проектированию и оснащению лабораторий. Компания предлагает комплексные технические решения для наших клиентов: **«Лаборатория под ключ из одних рук»** и обеспечивает клиентов высококачественным оборудованием с максимальным уровнем сервисной поддержки

«МИЛЛАБ» является официальным авторизованным дистрибьютором **Heidolph, Vacuubrand, Bruker, VELP, Binder, De Dietrich, LAUDA, Mettler Toledo, Merck, Nabertherm, Tuttnauer** и эксклюзивным представителем **Radleys** и **VTA**

### Почему «МИЛЛАБ»?

- Самое востребованное оборудование находится на складе в Москве
- Авторизованный сервисный центр: пуско-наладочные работы, аттестация оборудования, гарантийный ремонт, сервисное обслуживание
- Компания лицензирована ФСБ и имеет возможность для полномасштабного сотрудничества с предприятиями военно-промышленного комплекса
- Шесть филиалов в России: в Москве, Санкт-Петербурге, Екатеринбурге, Краснодаре, Новосибирске и Владивостоке

Подробная информация о компании и продуктах [www.millab.ru](http://www.millab.ru)  
г.Москва Дмитровское ш., д. 100, стр. 2 Т: + 7 (495) 933 71 47  
Бизнес-центр «North House» E: [info@millab.ru](mailto:info@millab.ru)



**Agilent Technologies**

Authorized Distributor





# ATCC - American Type Culture Collection



Американская коллекция клеточной микробиологии ATCC – ведущая мировая коллекция штаммов, клеточных линий и других биоресурсов для контроля качества и научных исследований.

- Клеточные линии
- Штаммы
- Культуры клеток
- Вирусы
- Первичные клетки
- Бактерии
- Стволовые клетки
- Сыворотки
- Наборы раковых клеточных линий
- Наборы для определения пролиферации клеток
- Иммутизированные клеточные линии hTERT
- Реагенты для трансфекции
- Нуклеиновые кислоты
- Системы экспрессии
- Набор для обнаружения микоплазмы

ATCC является самой большой и наиболее разнообразной коллекцией в своем роде. Мы имеем все необходимое для сохранения подлинности клеточных культур и продвижения Ваших исследований.

Ваших вопросов ждем по адресам:

В России:

**LGC Standards Sp. z o.o.**  
представительство

Гороховая улица, д. 47, офис 405

190031 Санкт-Петербург, Россия

Тел./Факс: +7 812 777 04 88

E-mail: ru@lgcstandards.com

WWW: www.lgcstandards.com



LGC Quality – ISO Guide 34 • GMP/GLP • ISO 9001 • ISO/IEC 17025 • ISO/IEC 17043

